



**DETERMINACION DE INFECCIONES CON *Leptospira spp* EN PACIENTES
FEBRILES DE ORIGEN DESCONOCIDO Y CON VIRUS DENGUE EN BARRANQUILLA**

GLORIA MERCEDES REYES CARMONA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ÉNFASIS EN ENFERMEDADES TROPICALES
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA
COLOMBIA
2011**

**DETERMINACION DE INFECCIONES CON *Leptospira spp* EN PACIENTES
FEBRILES DE ORIGEN DESCONOCIDO Y CON VIRUS DENGUE EN BARRANQUILLA**

GLORIA MERCEDES REYES CARMONA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Magíster
en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Enfermedades Tropicales**

DIRECTORA:

Dra. CLAUDIA ROMERO-VIVAS. PhD

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ÉNFASIS EN ENFERMEDADES TROPICALES
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA
COLOMBIA
2011**

**Aprobado por el profesorado de la
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
en cumplimiento de los requisitos exigidos
para optar el título de Magister en Ciencias
Básicas Biomédicas
con Énfasis en Enfermedades Tropicales**

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Barranquilla, Diciembre de 2011

A Dios y a mis hijos, Ricardo, Carlos y Zamir.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a Dios por su intervención en todas las etapas de mi vida.

A mis hijos por su comprensión y apoyo durante el desarrollo de mis estudios.

A mi asesora de tesis Dra Claudia M.E. Romero-Vivas por su dedicación, comprensión y colaboración a través de la maestría.

A la Universidad del Norte, por contribuir en mi formación académica y por su apoyo económico.

Al Dr Rafael Tuesca por sus útiles aportes y discusiones.

A la Universidad Metropolitana por el préstamo del microscopio de Fluorescencia.

Y a todas las personas que en algún momento me colaboraron en este camino, principalmente Elmy, Margareth, Martha, Rosmery.

Tabla de contenido

Resumen	13
Abstract	16
1.0 Introducción	19
2.0 Justificación	23
3. 0 Marco Teórico.....	26
3.1 Antecedentes Históricos	26
3.2 Generalidades	29
3.3 Aspectos epidemiológicos	38
3.3.1 Reservorio y fuente de infección	39
3.3.2 Caracterización epidemiológica	41
3.4 Patogénesis.....	48
3.4.1 Período de incubación	48
3.4.2 Modo de transmisión:	48
3.4.3 Acción patógena:	49
3.5 Clínica:	50
3.5.1 Formas menores.	51
3.5.2 Formas con participación de otros parénquimas	51
3.6 Inmunidad y control	53
3.7 Diagnóstico.....	55
3.7.1 Métodos de diagnóstico directos	55
3.7.1.1 Microscopía de campo oscuro	55

3.7.1.2 Aislamiento y cultivo de <i>Leptospira</i>	56
3.7.2 Métodos de diagnóstico indirectos	56
3.7.2.1 Técnicas serológicas	58
4.0 Objetivos	63
4.1 General	63
4.2 Específicos	63
5.0 Materiales y Métodos	65
5.1 Tipo o nivel de la investigación.	65
5.2 Población	65
5.2.1 Población Diana	65
5.2.2 Población accesible	65
5.2.3 Población elegible	65
5.3 Preparación de antígenos para las pruebas serológicas	67
5.3.1 Cultivo de Serovariedades de <i>Leptospira</i> spp.....	67
5.3.2 Cultivo de <i>Leptospira biflexa</i> Semarang cepa Patoc 1	67
5.4 Pruebas serológicas de tamizaje	68
5.4.1 Prueba de microaglutinación (MAT).....	68
5.4.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	70
5.4.3 Tamizaje de sueros pareados de pacientes	71
5.4.4 Prueba serológica para determinación de serogrupo patógeno circulante.	72
5.4.5 Determinación de co-infecciones <i>Leptospira</i> patógena y dengue	73
6.0. Consideraciones éticas	74
7.0. Análisis de datos	75

8.0. Resultados	77
8.1 Aspectos sociodemográficos de las personas encuestadas	77
8.2 Tamizaje de muestras pareadas por la prueba MAT e IFI	79
8.3 Determinación de infecciones recientes y pasadas por las pruebas MAT e IFI	84
8.4 Determinación de serovariedades patógenas de <i>Leptospira</i> spp circulantes en la población de estudio.	86
8.5 Determinación de Co-infecciones <i>Leptospira</i> /dengue.....	87
8.6 Caracterización clínica de pacientes con <i>Leptospira</i> spp, dengue, y co-infecciones.....	88
9.0. Discusión	93
10.0 Conclusiones	99
11.0 Bibliografía.....	101

Lista de Tablas

Tabla 1. Cuadro base para la interpretación de resultados prueba MAT.....	66
Tabla 2. Guía determinación casos positivos y negativos para MAT e IFI... ..	71
Tabla 3. Distribución por sexo.....	72
Tabla 4. Distribución por rangos de edad.....	72
Tabla 5. Distribución por ocupación.....	73
Tabla 6. Tamizaje de sueros con MAT/IFI usando como antígeno <i>L. biflexa</i> serovar Patoc 1.....	75.
Tabla 7. Comparación de pruebas MAT/IFI.....	75
Tabla 8. Sensibilidad y Especificidad de la primera muestra positiva con MAT y con IFI (IgM).....	76
Tabla 9. Sensibilidad y Especificidad de la primera muestra positiva con MAT y con IFI (IgG)	77
Tabla 10. Sensibilidad y Especificidad de la segunda muestra positiva con MAT y con IFI (IgM).....	77
Tabla 11. Sensibilidad y Especificidad de la segunda muestra positiva con MAT y con IFI (IgG).....	78
Tabla 12. Infecciones recientes y pasadas en los sueros MAT/IFI género específicos Positivos.....	79
Tabla 13. Comparación infecciones recientes y pasadas en los sueros MAT/IFI género específicos positivos.....	80

Tabla 14. Serovariedades de <i>Leptospira</i> spp patógenas/infecciones recientes.....	81
Tabla 15. Co-infecciones <i>Leptospira</i> spp patógena y dengue	82
Tabla 16. Síntomas más frecuentes observados en la población Estudiada.....	83
Tabla 17. Síntomas más frecuentes en pacientes confirmados con leptospirosis, dengue, y co-nfección.....	84
Tabla 18. Distribución de los casos positivos por barrios y estratos.....	85
Tabla 19. Distribución de los casos positivos por sexo.....	87
Tabla 20. Distribución de los casos positivos por rango de edad.....	87
Tabla 21. Distribución de los casos positivos por ocupación.....	87

Lista de Figuras

Fig. 1 <i>Leptospira</i> spp.....	34
Fig. 2 Pared bacteriana de <i>Leptospira</i> spp.....	34
Fig.3 Representación esquemáticas de la estructura de la pared de <i>Leptospira</i> spp.....	38
Fig. 4 Preparación de cepario para la realización del MAT.....	74
Fig 5. Leptospiras en microscopio de campo oscuro A. MAT control Negativo: leptospiras libres y B. MAT control positivo: aglutinación ≥ 50%.....	74
Fig 6. Preparación muestras A, sirviendo <i>L. biflexa</i> B, Lectura en microscopio de fluorescencia C y Control positivo de leptospiras fluorescentes D.	74
Fig 7. Distribución de casos agudos de leptospirosis en Barranquilla.....	86

Lista de Anexos

Anexo 1. Información general de los pacientes involucrados en el estudio.....	104
Anexo 2. Resultado del tamizaje con L.biflexa serovar Patoc por MAT e IFI....	106
Anexo 3. Determinación de serovares patógenos y de infecciones recientes y pasadas por la prueba MAT.....	109
Anexo 4. Determinación de títulos de IgM e IgG para <i>Leptospira</i> spp e infecciones recientes y pasadas por la prueba IFI.....	111
Anexo 5. Formulario para la investigación de casos de fiebre dengue, dengue hemorrágico, síndrome de shock por dengue y otras enfermedades hemorrágicas en el distrito de Barranquilla.....	119
Anexo 6. Ficha epidemiológica de pacientes hospitalizados.....	123
Anexo 7. Consentimiento escrito para la toma de muestra de sangre.....	129

Resumen

Objetivo: Determinar las infecciones con *Leptospira spp* en pacientes febriles de origen desconocido y con virus Dengue en Barranquilla

Métodos Es un estudio descriptivo retrospectivo transversal. A 98 sueros pareados de pacientes conservados a -80°C y que hacen parte del banco de sueros del Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte (86 procedentes de los silos 1 y 5, años 2000 – febrero 2001 y 12 sueros pareados de pacientes procedentes de los diferentes hospitales del Distrito de Barranquilla, año 2008) se les realizó pruebas de tamizaje por la prueba de oro, la microaglutinación (MAT) y por Inmunofluorescencia (IF), utilizando como antígeno *Leptospira biflexa* serovar Patoc 1 ; aquellos sueros positivos (títulos $\geq 1:100$) fueron probados por MAT con los serogrupos patógenos Icterohaemorrhagiae, Faneii, Grippotyphosa y Canicola en diluciones entre 1:50 – 1:3200. Los sueros positivos por IF, fueron diluidos en un rango de 1:40 a 1:2560. utilizando como antígeno *Leptospira biflexa* serovar Patoc 1 para detectar anticuerpos humanos IgM e IgG. Infecciones recientes y pasadas fueron determinadas por las dos técnicas. Signos y síntomas de pacientes con dengue y leptospira confirmadas fueron comparados

Resultados: Al comparar la MAT con la IFI para el tamizaje inicial de infecciones con *Leptospira spp* usando *L.biflexa*, hay diferencias significativas para la

detección de positivos, entre estas dos pruebas: MAT: 24.5% (IC 95%:15.7 – 36.4) vs IFI: 39.8% (39/98; IC 95% 28.3 – 54.4), $\chi^2 = 4,6$, $p \leq 0,05$, con un valor de concordancia moderado ($k=0.43$). Para la detección de infecciones recientes o pasadas con *Leptospira* spp, no hubo diferencias significativas entre estas dos pruebas χ^2 de 1,7; $p = 0,19$. Basados en los resultados obtenidos con la prueba de oro (MAT) la prevalencia de las infecciones con *Leptospira* spp patógena fue del 21.4% (21/98) (IC 95%: 13.3 - 32.8). Los serogrupos patógenos más frecuentes en infecciones recientes fueron Icterohaemorrhagiae (42,9% 6/14), Grippotyphosa (35,7% 5/14), Faneii (7,14% 1/14), y Canícola con Grippotyphosa (7,14% 1/14). Se encontró además, co-infección *Leptospira* – dengue (3,06% (3/98). Los síntomas más comunes para los pacientes confirmados con leptospirosis fueron fiebre (100%), seguido de cefalea, 85,7% y escalofrío (71,4%). No se observaron diferencias significativas en los síntomas presentados entre el grupo de personas que fueron diagnosticados con leptospirosis, dengue o co-infecciones. La mayoría de las personas (60,9%) enfermas eran estudiantes, de sexo masculino (59,3%), y más frecuente en los barrios de estrato socio-económico 1 y 2.

Conclusiones: El estudio permitió confirmar el uso de la prueba de oro para realizar el tamizaje de infecciones con *Leptospira* spp y la prueba IF para determinar infecciones recientes o pasadas con el objetivo de indicar al médico el inicio de tratamiento con antibiótico, ahorrando dinero, tiempo y riesgo de infección

Sin embargo la prueba de MAT, nos da información de importancia epidemiológica para enfocar medidas preventivas y de promoción de la salud, haciendo más efectivas las intervenciones en salud pública. En este estudio demostramos la necesidad de incluir la leptospirosis en el diagnóstico diferencial de enfermedades que cursen con fiebre, principalmente en pacientes con sospecha de dengue y la presentación de co-infecciones que en nuestra población, no representaron riesgo de severidad para los pacientes infectados.

Palabras claves: Leptospirosis, Dengue, seroprevalencia, IFI, MAT, co-infección

Abstract

Objective: To determine *Leptospira spp* infections in patients with either dengue fever (DF) or other febrile illnesses in Barranquilla.

Methods A cross-sectional retrospective descriptive study was performed. Ninety-eight paired sera were collected from patients in Silos 1 and 5 (2000-2001: n = 86), or different hospitals (2008: n = 12) in Barranquilla, and stored at – 85°C. All of these serum samples were tested for their reactions against *Leptospira spp.* antigens using the 'gold standard' micro-agglutination test (MAT) and an 'in house' immuno-fluorescence assay (IFA) using *Leptospira biflexa* (serovar Patoc 1). Patients' serum samples that were positive, at titers of $\geq 1:100$, in the MAT and with IgG or IgM titers of $\geq 1:40$ in the IFA, were further tested in the MAT against the most prevalent serogroups identified in Barranquilla (Icterohaemorrhagiae, Fainei, Grippotyphosa, and Canicola).

Recent and past infections with *Leptospira spp.* were determined by identifying increased titers against these bacterial pathogens using these two diagnostic assays. Evidence of exposure to potentially *Leptospira spp*-infected animals and these patients' clinical symptoms were assessed to support the serological results. Signs and symptoms of patients with confirmed dengue and *Leptospira* were compared.

Results: When the MAT and IFA results obtained using *L. biflexa* were compared, there were significant differences between these assays in their detection of

positive cases: MAT 24.5% (24/98) positive, (95% IC: 15.7-36.4); IFA 39.8% (39/98) positive, (95% IC: 28.3-54.4) ($X^2 = 46$, $p \leq 0.05$; moderate agreement value $k = 0.43$)). There were no significant differences between the MAT and IFA results for the detection of recent or past infections with *Leptospira spp.* ($\text{Chi}^2 = 1.7$, $p = 0.19$). Based on the results obtained using the 'gold standard' MAT, the sero-prevalence of this patient cohort with pathogenic *Leptospira spp.* was 21.4% (21/98), (95% IC: 13.3- 32.8). The most common pathogenic sero-groups that cause recent infections in these patients were Icteroharemorragiae (42,9%, 6/14), Grippotyphosa (35,7% 5/14), Fainei (7,14% 1/14). Three cases of *Leptospira spp.*-dengue virus (DENV) co-infections (3.06%: 3/98) were also found. The most common symptoms in the *Leptospira spp.*-infected patients were fever (100%), headache (85.7%), and chills (71.4%), but they did not display any hemorrhage manifestations. There were no significant differences in the symptoms presented amongst the groups of patients who were confirmed to have dengue fever, leptospirosis and the *Leptospira spp.*-DENV co-infections. The majority of these patients were male (59.3%) and students (60.9%), who lived in low (1 and 2) socio-economic strata.

Conclusions. This study confirmed and compared the detection sensitivity of the inexpensive 'gold standard' MAT and an 'in house-prepared' IFA for the detection of current or past infections with *Leptospira spp.*, using a large bank of paired patients' serum samples. Since the symptoms displayed by the leptospirosis

patients were non-specific, the collection of early acute-phase serum samples allowed early diagnoses to be obtained so that these positive patients could be promptly treated with the appropriate antibiotic therapies. These results also showed an important epidemiological pattern in Barranquilla which will allow the local health authorities to focus public health intervention programs. The co-infections of some of these patients with dengue viruses did not, as expected, display more severe disease symptoms.

Keywords: leptospirosis, dengue, sero-prevalence, co-infections, IFA, MAT.

1.0 Introducción

La leptospirosis es una zoonosis aguda, reemergente, de distribución mundial, principalmente en lugares que presentan inadecuadas condiciones sanitarias. Esta enfermedad es producida por especies patógenas del género *Leptospira*. La transmisión del agente infeccioso, se hace a través de la piel normal o erosionada y de las membranas mucosas, por contacto directo con orina, líquidos uterinos y placentas de los animales infectados o indirectamente por el contacto con los suelos y aguas superficiales contaminadas con orina o fluidos corporales de animales infectados. También se puede dar por la exposición a ambientes que permiten la supervivencia de los microorganismos en animales portadores sanos como es el caso de los roedores silvestres y animales susceptibles (Cruz et al, 2005).

El género *Leptospira* (que incluye especies patógenas, patógenas intermedias y no patógenas) pueden ocupar diversos ambientes, hábitat y huéspedes animales donde algunos actuarán como hospederos de mantenimiento o accidental (Alfaro et al, 2007). Generalmente se reconoce que estas bacterias son virtualmente ubicuas en términos de su distribución geográfica, estando presentes en todo el planeta con excepción de la Antártica. La mayoría de las *Leptospira* ssp, sin embargo, son hidrofílicas, es decir, una alta humedad y pH neutro o ligeramente alcalino (6.9 - 7.4), son esenciales para su supervivencia en reservorios naturales,

aguas estancadas, pantanos, lagunas, estanques, y charcos. Se ha implicado con frecuencia a los roedores y otros mamíferos en la diseminación de *Leptospira* por razón del tropismo del microorganismo por el riñón, liberándose al ambiente en la orina del animal (Madigan et al, 2009; Sacsquispe et al, 2003). En el mundo, la infección se ha identificado en aproximadamente 160 especies de mamíferos. Cada serovar tiene su o sus especies de animales hospederos predilectos, pero cada especie puede ser hospedero de uno o más serovares. Así por ejemplo, el serovar Pomona tiene como hospederos principales al cerdo y al bovino, pero puede infectar en forma transitoria a otros hospederos animales; así mismo, el reservorio de la serovar Canícola, es el perro pero en ocasiones se le puede encontrar en cerdos, zorros y bovinos (Alexander et al, 1991).

El estudio de la epidemiología de la leptospirosis es complejo debido al gran número de factores que influyen en su presentación, lo cual dificulta la extrapolación entre las diferentes regiones geográficas y obliga al conocimiento individualizado de cada continente, país, región o zona. Las distintas cepas patógenas de *Leptospira* pueden afectar potencialmente a los mamíferos.

La leptospirosis tiene una alta prevalencia en los países tropicales donde hay grandes precipitaciones pluviales y el suelo es neutro o alcalino. La presentación en el hombre varía en diferentes partes del mundo, puede darse en forma

esporádica o en brotes epidémicos. En general, los brotes se producen por exposición a aguas contaminadas con orina de animales infectados. Varios grupos ocupacionales están especialmente expuestos, tales como trabajadores de arrozales, cañaverales, minas, alcantarillados y mataderos, cuidadores de animales, médicos veterinarios y militares (Madigan et al, 2009).

La *Leptospira* para producir la enfermedad, penetra en el hombre a través de la piel erosionada o mucosas sanas, difunde rápidamente y después de 48 horas se la encuentra en todos los tejidos, con localización especial en riñón, hígado, corazón y músculo esquelético (fase leptospirémica de la enfermedad). Por su resistencia a la actividad bactericida del suero normal y en ausencia de anticuerpos específicos no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos. Entre los días 5 y 7 los anticuerpos específicos formados favorecen la opsonización del microorganismo que deja de ser encontrado en la sangre y se elimina por la orina durante semanas o meses (fase inmune o de leptospiruria).

La leptospirosis puede ser considerada como una enfermedad generalizada, sistémica, traducida fundamentalmente por una vasculitis infecciosa. La lesión vascular, predominantemente capilar, es un factor prominente y responsable del edema y la diátesis hemorrágica. Afecta fundamentalmente a los capilares de hígado, pulmón y riñón. El gran daño celular en presencia de pocos microorganismos sugirió la mediación de factores tóxicos tanto de la espiroqueta

como del hospedero. Al igual que la pobreza de alteraciones patológicas en determinados órganos, todo lo anterior hizo pensar que muchos de los aspectos de la enfermedad fueran ocasionados por productos tóxicos liberados por la bacteria. Durante la fase septicémica la migración de bacterias, toxinas, enzimas y/o productos antigénicos liberados a través de la lisis bacteriana conducen a una permeabilidad vascular aumentada que es la manifestación más precoz y constante de la enfermedad (Bracelli, 2005). Diagnosticada a tiempo, esta enfermedad puede ser tratada exitosamente con antibióticos especialmente la penicilina. Desafortunadamente por ser una enfermedad desatendida y por presentar signos y síntomas compatibles con otras enfermedades como el dengue, un método de laboratorio rápido, sensible y específico es requerido tanto para la obtención de un diagnóstico y la realización de un manejo clínico oportunos.

En este estudio comparamos la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con la prueba de microaglutinación (MAT), considerada como la prueba serológica en sueros de pacientes inicialmente sospechosos de estar infectados con el virus dengue.

2.0 Justificación

En áreas tropicales los pacientes febriles deben ser estudiados teniendo en cuenta las enfermedades endémicas en estas áreas como son malaria, dengue, leptospirosis, fiebre tifoidea, hepatitis y hantavirus.

La prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira se ha evidenciado en un estudio realizado en Jáltipan Veracruz, México, donde se encontró una seroprevalencia global contra leptospira de 4% (IC95%), y de 79.6% (IC95% 76-81) para denguevirus. La mayor prevalencia fue para el grupo en edad productiva (35%, IC95%), quienes refirieron convivir simultáneamente con perros, cerdos, vacas y ratas presentando una seroprevalencia de 25% (IC95%). El 85% de los positivos a leptospira también fue positivo a dengue (Navarrete, 2006).

En Colombia, entre 2000 y 2005 se conocen sólo cuatro estudios de prevalencia de leptospirosis en humanos; en la ciudad de Cali en personas sintomáticas con una prevalencia de 23,6% (Ferro, B et al 2006); en el municipio de Don Matías (Antioquia) en trabajadores agrícolas, con tasas de ataque de 6.4 y 22.4% Ochoa et al, 2001). En el departamento del Atlántico se realizó un estudio entre Enero 1999 – Marzo de 2004, en el que se encontró un 9.7% de positividad para leptospirosis, siendo Barranquilla el municipio que presentó más casos positivos Macías J. et al, 2005) Y por último en el departamento de Córdoba, se realizó un

estudio donde se encontró una prevalencia elevada de antecedentes de infección, con presencia de anticuerpos IgM en 13.1% de la población (Saholeth et al, 2005).

Se han realizado estudios comparativos entre técnicas de diagnóstico rápido para la detección de leptospirosis en pacientes sospechosos de leptospirosis; como el estudio comparativo entre la prueba de microaglutinación (MAT) y la prueba de ELISA indirecta estandarizada con un “pool” de antígenos de *Leptospira interrogans*, para la detección de anticuerpos IgM, en muestras de suero de fase aguda de leptospirosis humana, se obtuvo una sensibilidad de 97,5% y especificidad de 98,75%, no observándose reacción cruzada con otras enfermedades, llegaron a la conclusión de que el ELISA IgM validado en el laboratorio es suficientemente sensible, específico y de fácil aplicación para el uso como prueba de tamizaje en una infección por *Leptospira* con la subsecuente confirmación por MAT (Céspedes et al, 2002. Se compararon, además, las técnicas MAT, aislamiento e inmunofluorescencia indirecta (IFI), a partir de tejido renal. El método de aislamiento presenta sensibilidad del 0% y especificidad del 100% relativo al MAT, no observándose concordancia entre estos dos métodos diagnósticos utilizados en el presente trabajo. El método de IFI presenta sensibilidad de 57,1% y especificidad de 97,7% relativo al MAT, observándose una concordancia del 62,3%. La prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) presenta mayor sensibilidad y especificidad que los métodos diagnósticos de Aislamiento e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Silva et al, 2007).

Por presentar cuadro clínico semejante a fiebre dengue y teniendo en cuenta que la leptospirosis es una zoonosis raramente diagnosticada en toda Colombia probablemente por falta de conocimiento de la enfermedad o por ausencia de métodos diagnósticos en los laboratorios, esta ha sido subdiagnosticada principalmente en nuestro medio, y la alta prevalencia encontrada en los diferentes estudios mencionados anteriormente, incentivó la realización de esta investigación, en una cohorte de pacientes estudiados para determinar las infecciones con el virus dengue, de los cuales solo el 35% de los casos fueron confirmados como fiebre dengue, ya sea por técnicas serológicas o por aislamiento viral. En los restantes 65% de pacientes, el diagnóstico no fue determinado por lo cual nos planteamos las siguientes preguntas 1). Del 65% de pacientes con fiebre de origen desconocido ¿qué porcentaje corresponde a leptospirosis? 2) ¿Podría presentarse co-infecciones dengue/leptospira en esta población? 3) ¿Podría usarse la técnica de inmunofluorescencia indirecta como prueba de tamizaje y de confirmación del tipo de infección (reciente o activa) que presenten los pacientes positivos?

3.0 Marco Teórico

3.1 Antecedentes Históricos

Las primeras reseñas sobre leptospirosis humana datan de la época de la invasión napoleónica a Egipto y de la guerra civil americana (Ratram, 1994). Sin embargo, es posible que la leptospirosis haya tenido origen en el sudeste asiático, y que sólo en épocas recientes (medida en milenios) se haya producido la dispersión a Europa. La gran penetración de *R. norvegicus* en este continente a partir de 1729 favoreció la difusión de *L. icterohaemorrhagiae*. Se tiene conocimiento que estas ratas no avanzaban más allá del Volga hacia 1790. Hasta el siglo XVIII la rata predominante en Europa era *R. rattus* cuyo papel en la epidemia de peste del siglo XIV (1346-1352) ha sido ampliamente estudiado. La mayor diversidad de serovares y reservorios en Asia (Ej. Indonesia y Malasia) apoyaría el origen propuesto de la enfermedad (Seijo, 2009).

En América aparecen serovariedades cuyo origen podría ser importado a través de la colonización y la introducción de animales de cría y compañía (Seijo, 2009). Probablemente Lacereaux (“Leçons de la pitié”) hizo en 1802, la primera descripción clínica de leptospirosis mientras que en 1883 Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias denominándolo tifus hepático (“typhus hepatique grave ou bénin”). Tres años después, en 1886, Mathieu en Francia y

Weil en Alemania describen cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de agresión renal. Goldschmidt en 1887 propuso el nombre de Enfermedad de Weil (Laguna, 2000).

El mismo equipo japonés encontró la relación de este microorganismo con las ratas de desagüe y al estudiarlas encontraron que el 40% de esas ratas eran portadoras de la *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Laguna, 200).

En Europa, en la Primera Guerra Mundial (1914-1918), investigadores británicos, Stokes, Ryle y Thitler, estudiaron cien casos de leptospirosis en soldados del frente francés, asociando esta epidemia a la profusión de ratas en las trincheras, conclusión a la que llegan otros autores como Dawson, Hume y Bedson (1917) en Bélgica, Costa y Troisier (1916) en tropas francesas (1917) en el frente italiano (Laguna, 2003).

El primer aislamiento en humanos se realizó en Japón en 1917, en un paciente icterico y manifestaciones hemorrágicas y se llamó *icterohaemorrhagiae*. Más tarde, en 1918, se pudo aislar el serovar Hebdomadis en un paciente anictérico que mantuvo fiebre por 7 días; con posterioridad, en 1925, se identificó el serovar Autumnalis en Indonesia (Roca, 1989). Entre los años 1917 y 1918 Noguchi

estudió varias muestras aisladas en diferentes lugares y propuso la creación del género *Leptospira* (Laguna, 2000).

Los primeros casos de leptospirosis en las Américas fueron descritos en Cuba, la forma clínica icterohemorrágica provocada por la infección leptospirósica se conocía muy bien desde la segunda mitad del siglo pasado y los médicos sabían diferenciarla de la fiebre amarilla (Roca, 1989). En 1868, cuando el doctor *Francisco Navarro y Valdés* sospechó de la leptospirosis, expuso sus primeras referencias en su tesis para el doctorado “La fiebre biliosa de los países cálidos no es la fiebre amarilla, sino una enfermedad icterohemorrágica precedida por fiebre, que es padecida por individuos radicados en lugares pantanosos y que aparece en ciertas épocas del año” (González, 1997). Los primeros estudios acerca de la enfermedad comienzan a partir de 1921, después de un brote epidémico surgido en La Habana entre los obreros que construían el alcantarillado. Antes de 1959, los estudios fueron aislados y se reportaron casos por diferentes autores. Tras algunas investigaciones se confirman casos en la década de los 60 (García, 2001).

En un hospital de Lima en 1917, Arce y Ribeyro describieron el primer caso de leptospirosis en el Perú (García, 2001).

En Argentina el primer caso de leptospirosis humana, fue comunicado por Grapiolo, Fossati y Palazzo de una enferma procedente de Rufino (Santa Fe, 1925). Varios años antes Uriarte (1917-18), Spada (1919) y Morales Villazón (1923) investigan la “espiroquetosis hemorrágica” en ratas, pero sin resultados. En 1934 en el Departamento de Peste del Instituto Bacteriológico C. Malbrán, Edmée Chiodi aislaron *Leptospira* a partir de riñones de ratas, primera comunicación en Argentina en roedores (Seijo, 2009).

En Colombia hay informes aislados de leptospirosis desde 1933, en trabajos con más orientación a identificar los reservorios animales Acosta et al, 1994). El primer caso humano en el país se informó en 1968 (Bravo, 1998) y en 1997 se publicó una serie en la que se hace referencia a los hallazgos histopatológicos, correspondientes a enfermos fallecidos en 1995 durante una epidemia en Barranquilla, con diagnóstico clínico y serológico de leptospirosis icterohemorrágica (Perez-García, 1997).

3.2 Generalidades

La taxonomía del género *Leptospira* es muy compleja lo que ha originado gran confusión. Tradicionalmente, el género se ha agrupado por sus propiedades fenotípicas en:

Dominio: Bacteria;

Phylum: *Spirochaetes*

Clase: *Spirochaetes*

Orden: *Spirochaetales*;

Familia: *Leptospiraceae*;

Género: *Leptospira*;

Según la clasificación por genomoespecie se han notificado veinte especies de *Leptospira* divididas en 5 no patógenas, siete patógenas intermedias y ocho patógenas, sin embargo por sus relaciones antigénicas se agrupan en serogrupos y serovariedades. La clasificación actual de las *Leptospira ssp*, se muestra a continuación.

Clasificación de *Leptospira ssp* según Ko 2009

ESPECIES	SEROVAR	SEROGRUPO	SEROVAR	SEROGRUPO
Patógenas				
<i>L. alexanderi</i>	Lushui	Manhao	Nanding	Hebdomadis
<i>L. alstoni</i>	Grippotyphosa			
<i>L. borgpetersenii</i>	Arborea	Ballum	Jules	Hebdomadis
	Balcanica	Sejroe	Mini	Mini
	Ballum	Ballum	Sejroe	Sejroe
	Hardjo (Hardjobovis)	Sejroe	Tarassovi	Tarassovi
	Javanica	Javanica		
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Icterohaemorrhagiae	
	Icterohaemorrhagiae			
	Autumnalis	Autumnalis	Kennewicki	Pomona

	Bangkok	Australis	Kremastos	Pomona
	Bataviae	Bataviae	Lora	Australis
	Bratislava	Australis	Medanensis	Sejroe
	Broomi	Canicola	Mwogolo	
	Icterohaemorrhagiae			
	Bulgarica	Autumnalis	Naan	
	Icterohaemorrhagiae			
	Canicola	Canicola	Paidjan	Bataviae
	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	Pomona	Pomona
	Djasiman	Djasiman	Pyrogenes	Pyrogenes
	Hardjo (Hardjoprogino)	Sejroe	Szwajizak	Mini
	Hebdomadis	Hebdomadis	Zanoni	
	Pyrogenes			
<i>L. kirschneri</i>	Bim	Autumnalis	Mwogolo	
	Icterohaemorrhagiae			
	Bulgarica	Autumnalis	Mosdok	Pomona
	Cynopteri	Cynopteri	Kunming	Pomona
	Grippytyphosa	Grippytyphosa		
<i>L. noguchii</i>	Bajan	Australis	Louisiana	Louisiana
	Fortbragg	Autumnalis	Panama	Panama
<i>L. santarosai</i>	Bataviae	Bataviae	Pyrogenes	Pyrogenes
	Barincana	Hebdomadis	Tabaquite	
	Kremastos	Hebdomadis	Tinidad	Sejroe
	Navet	Tarassovi	Weaveri	Sarmin
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Mengma	Javanica
	Hainan	Celledoni	Sarmin	Sarmin
Intermedias				
<i>L. broomii</i>	Undesignated	Undesignated		
<i>L. faineii</i>	Hurstbrige	Hurstbrige		
<i>L. licerasiae</i> +	Varillal			

<i>L. inadai</i>	Lyme	Lyme
<i>L. wolffii</i> +++		
No patógenas		
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Semaranga
<i>L. Kmetyi</i>	Malaysia	
<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Sejroe
<i>L. terpstrae</i>		
<i>L. vanthieli</i>		
<i>L. wolbachii</i>		
<i>L. yanagawae</i>		

Las *Leptospira ssp* son espiroquetas delgadas y enroscadas (0.1 por 6 a 20µm) que poseen un gancho puntiagudo en uno o en varios extremos y dos flagelos periplasmicos que prolongan la longitud de la célula bacteriana y se anclan en dos extremos opuestos, ocupándose de la movilidad. Las *Leptospira ssp* son aerobias obligadas y su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C a 30°C en medios de cultivos complementados con vitaminas B2, B12, entre otras, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio. Por tanto, los microorganismos se pueden cultivar a partir de muestras clínicas procedentes de sujetos infectados (Murray, 2009).

Es tan delicada que en el campo oscuro se pueden observar solo como una cadena de cocos diminutos. No se tiñe con facilidad pero puede impregnarse con plata, son estructuralmente Gram negativas, por tanto, su pared está compuesta

por tres capas: la interna que corresponde al peptidoglicano, el espacio periplasmico con sus enzimas y unido por las lipoproteínas de Braun a la membrana externa constituida principalmente por el lipopolisacárido (LPS) las lipoproteínas (Lp), conteniendo además fosfolípidos (Murray, 2009). (Fig 1 y 2)

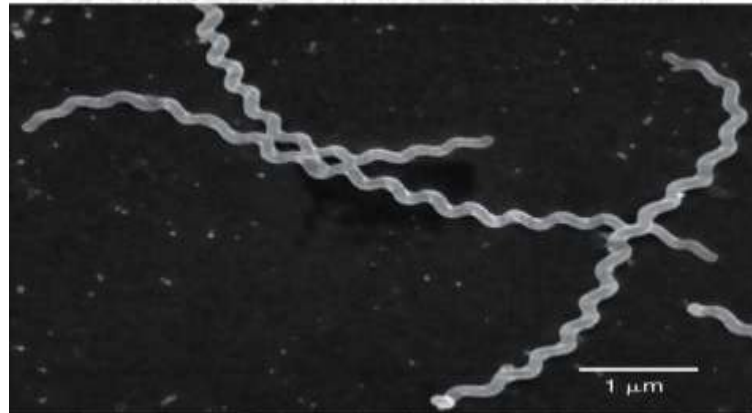


Fig 1. *Leptospira* spp. Fuente: Elsevier, Inc. – Elsevierimages.com

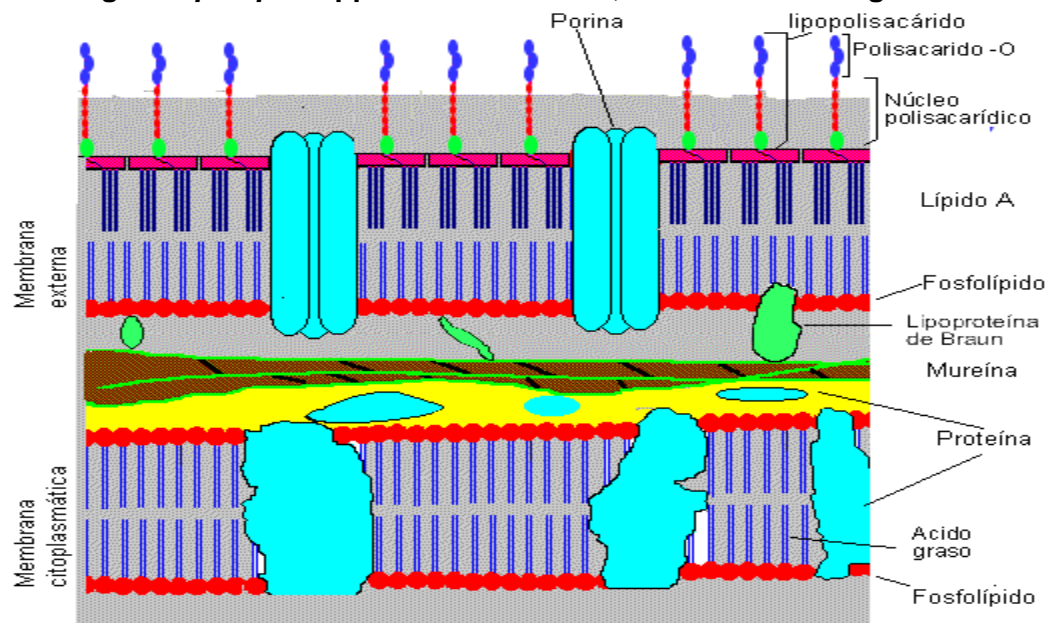


Fig 2. Pared bacteriana de *Leptospira* spp. Fuente: Raissman, JS, Gonzalez, Ana M..

El Lipopolisacárido (LPS) es el principal antígeno de superficie de la *Leptospira*, es el objetivo de anticuerpos aglutinantes, opsonizantes y es un importante antígeno protector. El LPS es la clave de los antígenos que participan en el sistema de clasificación serológica de la *Leptospira*, permitiendo el reconocimiento de más de 200 serovares. Significativamente, la inmunidad a la infección se correlaciona con el serotipo, relacionado principalmente con el LPS. A pesar de la importancia de este componente, la estructura de LPS leptospiral sigue siendo desconocida y existe un conocimiento limitado de su biosíntesis y, en consecuencia, de la base molecular de la inmunidad y de la especificidad de los serotipos. Se ha adoptado un enfoque genético para tratar de comprender la base de la especificidad del LPS, a partir de la comparación de los subtipos del serotipo Hardjo, a saber Hardjobovis y Hardjoprajitno que son antigénicamente indistinguibles pero clasificados en distintas especies (*L. borgpetersenii* y *L. interrogans*, respectivamente). Los lugares de biosíntesis del LPS para ambos tipos son similares y se encontraron genes implicados en la biosíntesis del azúcar y de la subunidad de transporte. (Macedo, 2005).

Se han realizado una serie de estudios que permitieron determinar la ultraestructura de la pared celular de la *Leptospira* y la ubicación de las proteínas en la membrana externa (OM). Las proteínas de membrana externa recombinantes (OMPs) de la *Leptospira* pueden producir inmunidad contra la

leptospirosis en un modelo de infección en hámster. Anteriormente se caracterizaron OMPs las cuales aparecen altamente conservadas y, por ende, se puede determinar su capacidad para estimular la inmunidad heteróloga (Cullen, 2002). Entre las lipoproteínas de la membrana externa encontradas están LipL32, LipL36, LipL41, y LipL48. No se conocen las proteínas celulares en ubicación distinta de la membrana externa (Cullen, 2002).

En este estudio se llevó a cabo un análisis global de las OMPs de la *Leptospira*, que fueron obtenidas por extracción con Triton X-114. Las fracciones de membrana externa fueron aisladas de *Leptospira interrogans* serovar Lai, crecida a 20, 30 y 37° C, con o sin 10% de suero fetal de ternero y, por último, con depleción de hierro en el medio de cultivo. Las OMPs fueron separadas por electroforesis en gel, en dos dimensiones, Las Proteínas identificadas por este método incluyeron las lipoproteínas de la membrana externa, LipL32, LipL36, LipL41, y LipL48 y se determinó la secuencia de los péptidos de ocho nuevas proteínas designadas PL18, PL21, pL22, pL24, pL45, pL47/49, pL50, y pL55. (Cullen, 2002)

La membrana externa (OM) de la *Leptospira kirschneri*, patógeno de mamíferos, fue aislada en forma de vesículas de membrana por plasmólisis alcalina, recuperándose dos poblaciones de vesículas OM (OMVS), estas se encuentran

libres de fracciones protoplásmicas, determinándose otras proteínas como la de choque térmico GroEL, y dos nuevas proteínas de la membrana citoplasmática, lipoproteínas LipL31 y proteína transmembrana ImpL63, la OMP 48-kDa se identificó como una nueva lipoproteína, designándola LipL48. En conclusión, la utilización de marcadores específicos de membrana-OM en las técnicas de aislamiento facilita una descripción exacta de las OM de la *Leptospira* y sus componentes (Haak, 2002).

La identificación del subconjunto de proteínas de la membrana externa en la superficie de una célula bacteriana es fundamental para la comprensión de las interacciones de las bacterias con su medio ambiente y reduce enormemente la búsqueda de antígenos de protección de los patógenos extracelulares (Cullen, 2005). También se encontró que la capa externa de la *Leptospira* se podía estudiar utilizando *Leptospira* vivas biotiniladas, aprovechando la afinidad de estas por la biotina lo que permite la captura de las proteínas, en gel de electroforesis bidimensional, y en espectrometría de masa (EM). Obtuvo una capa que resultó estar predominantemente compuesta por un pequeño número de proteínas características, siendo en orden de abundancia relativa en la superficie de la célula: LipL32, LipL21, y LipL41. De estas proteínas, sólo LipL32 no se había identificado anteriormente como proteína de superficie (Fig. 3). La LipL32 de superficie fue verificada posteriormente por tres métodos diferentes: inmunofluorescencia de células enteras, ensayo inmunoenzimático (ELISA), y

microscopía inmunoelectrónica.

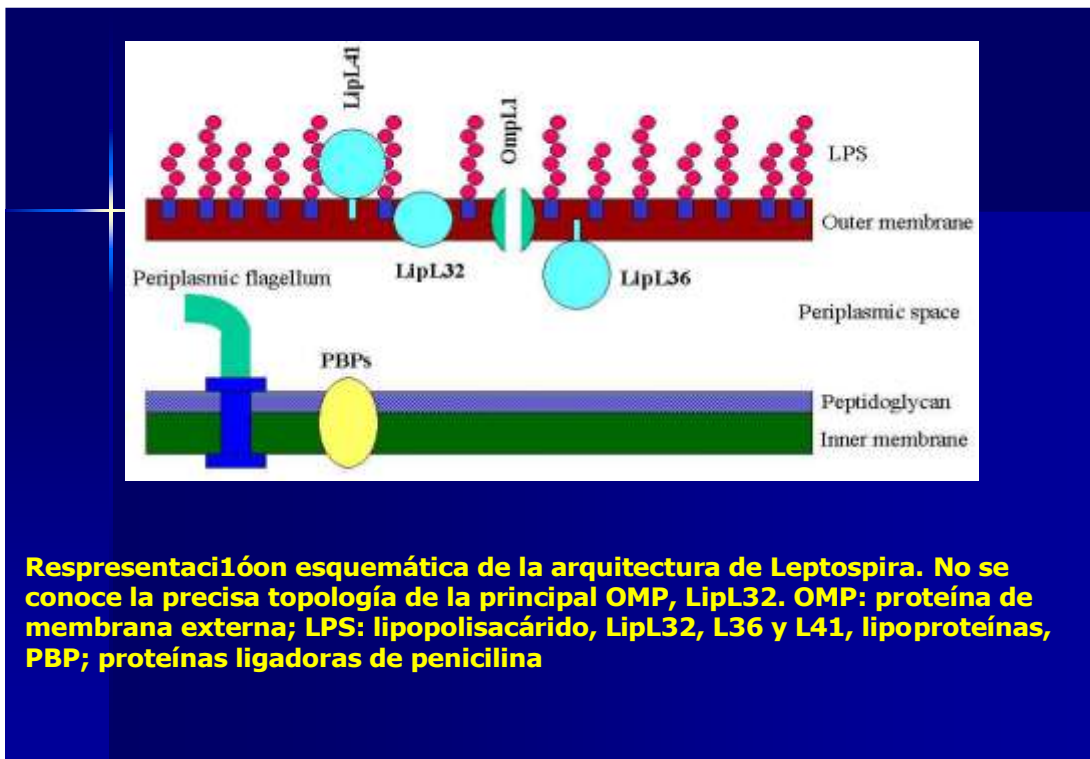


Fig 3. Representación esquemática de la estructura de la *Leptospira* ssp. Fuente: Dworkin Martin A handbook on the Biology of bacteria. Third edition. Vol 7. University of Minnesota. USA. 2006

Todas las proteínas son muy sensibles a la desecación, al calor y frío excesivo así como a las variaciones del pH no tolerando el medio ácido; el pH óptimo para la multiplicación de la *Leptospira* es 7,2- 7,4. En el agua salada no sobreviven, al contrario de los largos períodos que pueden permanecer en el agua dulce principalmente si se encuentra almacenada (hasta 180 días). En el frío puede sobrevivir hasta 100 días a -20°C . Es importante mencionar que la pasteurización no destruye a las *Leptospira* lo que indica que es necesaria la ebullición para

cumplir con su destrucción. A los 10 segundos muere a 100°C y solo a los 10 minutos si la temperatura es de 56°C (Oficina General de Epidemiología, 2000).

3.3 Aspectos epidemiológicos

La leptospirosis se comporta como una zoonosis reemergente, de presentación endémica, con brotes epidémicos, observándose un aumento de la tasa de incidencia en la mayoría de los países del Cono Sur.

Afecta al hombre y a los animales en forma endémica, representando un problema de salud pública en los países latinoamericanos. La enfermedad se presenta en brotes epidémicos en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, principalmente en épocas de lluvias e inundaciones, remarcando su carácter estacional y distribución cosmopolita.

El hombre es introducido en la cadena epidemiológica de modo accidental (hospedero transitorio), por contacto con el agua (importante medio de transmisión), suelo, o exposición directa a las excretas contaminadas de algunos roedores o animales domésticos y salvajes, infectados, adquiriendo la infección y enfermando algunas veces. Es rara la transmisión de persona para persona, pues el hombre representa el final de la cadena de transmisión.

La rata o ratón de alcantarilla (*Rattus norvegicus*) y el ratón negro o ratón del techo (*Rattus rattus*) son considerados reservorios ecológicos de la leptospirosis, no desarrollando síntomas de esta zoonosis (Carneiro et al, 2004).

3.3.1 Reservorio y fuente de infección

Los animales domésticos y silvestres infectados son los reservorios de mayor jerarquía en la leptospirosis rural, mientras que la rata lo es en la leptospirosis urbana. Por otra parte, se debe tener en cuenta que los roedores (*Rattus norvegicus* fundamentalmente) desempeñan un papel fundamental en la transmisión pues no sufren la enfermedad, albergan las *Leptospira* en los riñones, la eliminan vivas al medio ambiente por tiempo prolongado, contaminando así el agua, suelo y alimentos (Savio, 2002).

Los humanos o animales que no son los huéspedes de mantenimiento pueden llegar a infectarse accidentalmente y son llamados huéspedes “incidentales” o “accidentales”. Tales huéspedes con frecuencia desarrollan la enfermedad.

La distinción entre huésped natural o de mantenimiento y huésped incidental o accidental no siempre es claramente distinguible, especialmente en animales domésticos cuando son mantenidos en condiciones de hacinamiento que favorecen la transmisión (OMS, 2008).

Cada año se describen entre 100 y 200 infecciones en personas residentes en EE.UU., y más de la mitad de los casos corresponde a Hawái, sin embargo, la incidencia de la enfermedad está claramente subestimada puesto que la mayor parte de las infecciones son leves y se diagnostican de manera errónea como un “síndrome vírico” o como una meningitis vírica aséptica. Debido a que muchos estados no comunicaban esta enfermedad a los servicios Públicos de Salud, su declaración obligatoria finalizó en 1995. Por tanto, no se puede determinar la verdadera prevalencia de la enfermedad. Las *Leptospira* infectan dos tipos de anfitriones: “reservorio” y anfitriones accidentales. Las infecciones crónicas endémicas se establecen en los anfitriones reservorios, que actúan como reservas permanentes de las bacterias. Se han asociado distintas especies y serovariantes de *Leptospira* a anfitriones reservorios específicos (lo cual reviste importancia en los estudios epidemiológicos). Los reservorios más frecuentes son los roedores y mamíferos de pequeño tamaño. Las *Leptospira* suelen producir infecciones asintomáticas en su huésped reservorio en el que colonizan los túbulos renales y se eliminan en la orina en grandes concentraciones. Los riachuelos, los ríos, las aguas estancadas y la tierra húmeda se pueden contaminar con la orina de los animales infectados, ya que los microorganismos son capaces de sobrevivir hasta seis semanas en estas exposiciones profesionales a los animales infectados (granjeros, trabajadores de los mataderos y veterinarios). La mayoría de las infecciones que afectan al ser humano se registra durante los meses cálidos

cuando la exposición relacionada con actividades de ocio es más frecuente. No se ha documentado la transmisión horizontal de una persona a otra. Por definición el estado de portador crónico no existe en los anfitriones accidentales (Murray, 2009).

3.3.2 Caracterización epidemiológica

A nivel mundial los datos de incidencia de la enfermedad son diversos y dependen de características particulares de cada zona geográfica, pero es reconocido que es mayor la incidencia en regiones tropicales que en regiones templadas, que la transmisión se presenta tanto en países industrializados como en desarrollo y que aunque clásicamente la enfermedad se asocia a ambientes rurales y ocupaciones agrícolas y mineras, en los últimos años se reconoce que la enfermedad ha emergido en ambientes urbanos, con brotes epidémicos asociados con la presencia de roedores, período de lluvias e inundaciones y en personas que realizan actividades acuáticas ya sea recreativas, de aventura o deportivas.

En un estudio realizado en Barbados entre 1995 y 1997 se encontró que 38 de los 92 pacientes negativos (41%) para leptospirosis dieron dengue IgM positivo, mientras que 2 de 25 casos de leptospirosis también tuvo evidencia serológica de

dengue, indicando un 8% de coinfección dengue leptospirosis (Levette et al, 2000).

En Mumbai India, se reportó un caso de coinfección dengue – leptospirosis en una niña de dos años y medio de edad (Rele et al, 2001).

En Perú entre 2004 – 2005 se realizó un estudio sobre la etiología del síndrome febril agudo donde se encontraron 30 casos (2,9%) de *Leptospira* más virus dengue, y 3 (0,3%) casos a *Leptospira* más *Rickettsias* más virus dengue, determinándose coinfección en estos pacientes (Troyes et al, 2006).

En Caracas Venezuela se realizó un estudio donde se reportó un caso de coinfección leptospirosis-dengue, la leptospirosis se detectó con tres pruebas MAT, TR y PCR con iniciadores específicos para *Leptospira* patógenas y para dengue se utilizó la técnica de ELISA IgM de captura, IH y cultivo en células C636 (Lopez-Lopez, 2005).

Leptospirosis y dengue son dos de los principales problemas de salud pública asociados a altas tasas de mortalidad en el Brasil. La co-infección aguda por leptospirosis y dengue es extremadamente rara. El objetivo de este relato es el de describir el primer caso de co-infección por leptospirosis y dengue en un paciente oriundo de la Amazonia oriental brasileña (Crociati et al, 2010).

En Colombia en el Urabá Antioqueño se realizó un estudio en el 2006 y se encontró que del total de pacientes investigados seis fueron positivos simultáneamente para *Leptospira* ssp y Dengue. Los seis casos de coinfección compartían factores de riesgo (Agudelo et al 2006).

En Colombia la enfermedad se conoce desde 1933, pero las investigaciones no se han hecho en forma sistemática, los informes de casos son aislados, sin connotaciones endémicas y/o epidémicas, Epstein, 1995, cuando Bauer & Ken, estudiaron 132 ratas silvestres de la Sierra Nevada de Santa Marta sin hallar la espiroqueta. Más tarde en 1957 García-Carullo, encontraron en equinos y bovinos del Departamento de Caldas 30% y 14.7% de seropositividad respectivamente.

En 1969, Bravo et al. estudiaron un joven de 17 años que consideraron como el primer caso humano en Colombia con diagnóstico clínico y serológico. La enfermedad comprometió principalmente hígado, riñón y meninges y el germen aislado fue *L. canicola*. En 1989 Sebek et al. utilizaron 15 serogrupos (serovariedades) en el examen serológico de 332 adolescentes y adultos clínicamente sanos en 5 localidades del sur de Colombia y la positividad fue 18.4%.

Jesús A. Pérez-García, M.D. Durante el período lluvioso del segundo semestre de 1995 se presentó en Barranquilla un elevado número de cuadros febriles incapacitantes, de los cuales ingresaron al Hospital Universitario 23 pacientes en quienes, por pruebas serológicas de microaglutinación, se encontraron en 20 de ellos títulos positivos para los serogrupos *L.interrogans* Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola y Grippotyphosa. En el grupo admitido se presentaron 6 fallecimientos.

Estudio de prevalencia en poblaciones en riesgo del departamento de Córdoba, Colombia, entre febrero y abril de 2004 Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano (Saholet et al, 2005) S.

En nuestro medio se ha documentado concomitancia entre dengue y leptospirosis en pacientes con síndrome febril. En Córdoba se registró 4% de Salmonelosis y Dengue y 2% de salmonelosis, dengue y leptospirosis (Miranda et al, 2003).

En el Valle del Cauca, el 25% (106/419) de los pacientes presentaban infección aguda por virus del dengue y *Leptospira*. La mayoría de los casos de coinfección correspondió a pacientes con manifestaciones graves de la enfermedad (Parra et al, 2003).

Entre los años 2000 y 2005 se realizaron tres estudios de prevalencia de leptospirosis; uno en la ciudad de Cali en personas sintomáticas, y el otro en el municipio de Don Matías (Antioquia) en trabajadores agrícolas, con tasas de ataque de 6.4 y 22.8%. En el Departamento del Atlántico se realizó un estudio entre Enero 1999 – Marzo de 2004, en el que se encontró un 9.7% de positividad para leptospirosis, siendo Barranquilla el municipio que presentó más casos positivos (Ochoa et al 2001; Ferro et al, 2003; Macias et al, 2005).

En el país se han reportado prevalencias generales para diferentes poblaciones humanas desde 1957, encontrando 4,28% de sueros humanos positivos para *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. Posteriormente en 1989 se reporta una seropositividad general de 18,4% para cinco localidades colombianas principalmente por las serovariedades Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa. Para la población de Medellín se reporta una seropositividad general del 11,9%.

En el 2006 se reporta una seroprevalencia en habitantes de barrios periféricos de Cali del 23,3%, encontrando una frecuencia significativamente mayor en hombres que en mujeres y una asociación entre la seropositividad y el contacto con animales. Igualmente en población general urbana de nueve municipios de la zona del Urabá antioqueño se registró una seroprevalencia general del 12,5%. Seis de los nueve municipios registraron personas con presencia de anticuerpos contra

Leptospira, siendo los de mayor porcentaje Carepa, Necoclí y San Pedro de Urabá (27,3%, 25% y 25% respectivamente). Le siguen en frecuencia Apartadó 14,8%, Turbo 11,8% y Chigorodó, 7,5% (Valera, 2010).

Por la prueba de MAT las serovariedades más prevalentes fueron Grippotyphosa Icterohaemorrhagiae. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la seropositividad por edad, sexo, raza, oficio, años de residencia en la zona y características de la vivienda. Para el departamento de Córdoba y en población indígena rural, se obtuvo una seroprevalencia del 18,1% donde las serovariedades más prevalentes fueron Bratislava, Icterohaemorrhagiae y Panamá (Valera, 2010).

El único brote epidémico documentado en el país se inicia en agosto de 1995, en el departamento de Atlántico, con un total de 47 casos confirmados y 284 casos sospechosos, con una letalidad del 17% dentro de los casos confirmados, provenientes de varios municipios de ese departamento. Se aisló *L. interrogans* de las serovariedades Icterohaemorrhagiae, Pomona y Canicola. En 1999 se reportan los hallazgos histopatológicos de cuatro de los casos fatales de leptospirosis de esta epidemia, entre las que se cuentan hemorragias petequiales o equimóticas en músculos, riñones, hígado, suprarrenales, estómago, bazo y pulmones (Valera, 2010).

Con respecto a los grupos de riesgo ocupacional en el 2000 para Antioquia se reporta una prevalencia del 22,4% en operarios lecheros, en 2003, en trabajadores de explotaciones porcinas de Manizales, encontraron prevalencias desde 3,9% hasta 14,3%. En el 2005 determinaron una prevalencia para leptospirosis del 13,1% en un grupo de trabajadores de carnicerías y arroceras del departamento de Córdoba y en 2008 se reporta una seroprevalencia similar, 13,3%, para trabajadores del sector agrícola del departamento de Sucre (Valera, 2010).

Encuestas realizadas por el ICA entre 1995 y 1998, determinaron la seropositividad a leptospirosis en humanos entre el 12 y 20%, siendo el departamento del Atlántico el de mayor prevalencia (17%) con predominio de la serovariedad *Icterohaemorrhagiae*. Según los registros de Corpoica-Ceisa, en 1997, se estudiaron 75 muestras para leptospirosis humana provenientes principalmente de Cartagena (19), La Guajira (44) y Tolima (7), encontrándose reactividad en el 20% de muestras (Valera, 2010).

Para el año de 1998 se estudiaron un total de 201 sueros, de estos el 21,3% (43) fueron positivos y en mayor número en el departamento del Tolima. En 1999, se estudiaron 161 muestras, resultando positivas el 25,5%, el mayor número de muestras positivas correspondió al Distrito de Cartagena (Fuente: ICA-CEISA 2000). Durante el 2008 se procesaron 724 muestras de casos humanos, de las cuales el 16,2% fueron positivas, considerando la muestra positiva al tener una

reacción de aglutinación a uno o más serovares mostrando título > a 1/100 (Valera, 2010).

3.4 Patogénesis

3.4.1 Período de incubación

El período de incubación oscila entre 1 y 3 semanas con un promedio de 10 días.

3.4.2 Modo de transmisión:

Las *Leptospira ssp* son transmitidas de animal a animal y del animal al hombre. La transmisión interhumana es rara y sin importancia práctica. La forma más frecuente de transmisión al hombre consiste en la exposición a orina, sangre, tejidos u órganos de animales infectados o indirectamente, a través del contacto con agua, suelo húmedo o vegetación contaminados con orina de animales infectados, como ocurre al nadar o por inmersión accidental u ocupacional.

La puerta de entrada es la piel excoriada, la piel íntegra pero que ha permanecido inmersa en agua por tiempo prolongado y las mucosas íntegras: orofaríngea, nasal, ocular o genital.

La ingestión de agua o alimentos contaminados (incluida la leche) es una modalidad poco importante de transmisión por su baja frecuencia. Se ha descrito también la transmisión accidental en laboratorio.

Período de transmisibilidad:

Mientras exista leptospiuria, la que es permanente en el caso de los portadores sanos (roedores). Los animales convalecientes eliminan *Leptospira* durante un mes aproximadamente, pero se han observado leptospiurias de animales y humanos de hasta once meses después de la enfermedad aguda (Savio, 2002).

3.4.3 Acción patógena:

Las *Leptospira* patógenas pueden producir una infección subclínica, una enfermedad seudogripal febril leve, o una enfermedad sistémica grave (Enfermedad de Weil), con insuficiencia hepática y renal, vasculitis extensa, miocarditis y fallecimiento. La gravedad de la enfermedad se ve influida por el número de microorganismos implicados en la infección, el estado inmunitario del huésped, y la virulencia de la cepa infectante. Debido a que las *Leptospira* son delgadas y móviles, pueden penetrar a través de las membranas mucosas intactas o la piel a través de pequeños cortes o abrasiones. Se pueden extender a través de la sangre hasta todos los tejidos incluyendo el sistema nervioso central.

L. interrogans se multiplica rápidamente y daña el endotelio de los pequeños vasos, lo que da lugar a las principales manifestaciones de la enfermedad (meningitis, disfunción hepática o renal, hemorragia). Los microorganismos se pueden encontrar en la sangre o LCR al inicio de la enfermedad, y en la orina en los últimos estadios. La eliminación de las *Leptospira* tiene lugar como consecuencia del desarrollo de la inmunidad humoral. Sin embargo, algunas manifestaciones clínicas pueden provenir de reacciones inmunológicas frente a los microorganismos. Por ejemplo. La meningitis se desarrolla con posterioridad a la eliminación de los microorganismos del LCR y de la detección de inmunocomplejos en las lesiones renales (Murray, 2009).

3.5 Clínica:

Luego de ingresada la *Leptospira* al hospedero susceptible, se disemina por vía hemática y linfática a diferentes órganos.

Pueden observarse dos situaciones generales:

Infección leptospirósica: en la que no hay ninguna manifestación clínica y sólo se traduce la exposición al agente si el paciente es sometido a una encuesta serológica poblacional con determinación de anticuerpos.

En la Leptospirosis clínica, se reconocen:

3.5.1 Formas menores.

Se trata de un cuadro seudogripal con fiebre elevada desde el inicio, de 39 a 40°C, que se acompaña característicamente de mialgias intensas y difusas, muchas veces predominando en región lumbar. Hay malestar general y del examen físico se destaca la hiperemia conjuntival, muy constante y orientadora aunque inespecífica. Excepcionalmente puede comprobarse un rash cutáneo de breve duración. Hasta en 50% de los casos puede observarse diarreas, náuseas y vómitos

3.5.2 Formas con participación de otros parénquimas

Ictérica: A los elementos anteriores se agrega una ictericia cutaneo-mucosa con prurito difuso, hipocolia y acolia, asociando discreta hepatomegalia. Típicamente se describe el aspecto de la ictericia como de un tono especial anaranjado, surgiendo de la combinación de ictericia asentada en una piel con vasodilatación subyacente.

Insuficiencia renal: Esta puede darse como excepción aisladamente, o mucho más frecuentemente integrarse a la ictericia. Se trata de una insuficiencia renal oligoanúrica severa y con las disonías correspondientes como elemento acompañante. Esta insuficiencia renal es reversible y puede ir a la curación completa sin secuelas. Es también posible ver la insuficiencia renal en el contexto

del síndrome hepatorenal, de grave pronóstico, y en el cual a la ictericia se asocia falla renal aguda e insuficiencia circulatoria periférica. El patrón histológico suele ser el de una nefritis intersticial, pero también en algunos casos son observables pequeños cambios en los glomérulos. Este último hallazgo podría ser la base anatómica para la tan frecuente proteinuria de la leptospirosis. La alteración funcional renal puede o no tener factores pre-renales, y cuando el deterioro funcional está presente, suele ser desproporcionado en relación al daño anatómico.

Formas meníngeas: Excepcionalmente la leptospirosis puede presentarse como una meningitis aguda con LCR claro sin otros elementos acompañantes. La participación meníngea, más habitualmente, acompaña al síndrome pseudogripal o a la ictericia y falla renal. Se presenta con cefalea, foto y acusofobia y rigidez de nuca. En la década de los 80 se evaluaron en Montevideo 120 pacientes con leptospirosis y se encontró el 28,3% con manifestaciones neurológicas, siendo éstas prácticamente en su totalidad meningitis agudas con LCR claro (Savio, 2002).

Formas pulmonares. Confieren especial gravedad a la enfermedad. Obedecen a una neumonitis hemorrágica que se presenta con tos, disnea y expectoración hemoptoica, acompañándose de grados variables de insuficiencia respiratoria.

Esta insuficiencia respiratoria, a los efectos de homologar definiciones, puede ser catalogada como un cociente $paO_2/FiO_2 < 300$ y/o un gradiente alvéolo/arterial de $O_2 > 20\text{mmHg}$.

La leptospirosis se presenta entonces como una variable mezcla de compromisos parenquimatosos abarcando desde formas asintomáticas, a una muy alta proporción de cuadros seudogripales, y en el resto de los casos se presenta más convencionalmente como una hepatitis con o sin toque renal clínico o subclínico, acompañado eventualmente de meningitis. En casos extremos de participación parenquimatosa, se presenta auténticamente como un síndrome de disfunción orgánica múltiple. Cualquiera sea la presentación clínica no se debe olvidar que frecuentemente se objetivan elementos hemorrágicos como petequias y equimosis. Es por último también posible observar:

- miocarditis, expresada por arritmias
- uveítis como evento diferido y secundario a la etapa de curación del resto de la enfermedad (Savio, 2002).

3.6 Inmunidad y control

Los seres humanos reaccionan a una infección por *Leptospira* con la producción de anticuerpos específicos anti *Leptospira*. La seroconversión puede ocurrir de 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad pero algunas veces solo después

de 10 días o incluso más, especialmente si se implementó tratamiento con antibióticos. Los anticuerpos IgM aparecen, generalmente, más temprano que los anticuerpos de clase IgG y, permanecen usualmente detectables por meses o aún años aunque a bajos títulos.

La detección de anticuerpos IgG es más variable; algunas veces pueden no ser detectables en absoluto o ser detectables por períodos relativamente cortos de tiempo, pero ocasionalmente pueden persistir por varios años. Los anticuerpos son dirigidos contra:

- Antígenos comunes (llamados antígenos género específicos) que son compartidos por todas las *Leptospira* tanto patógenas como saprofitas;
- Antígenos serovar específicos y serogrupo específicos.

Los pacientes con leptospirosis pueden producir anticuerpos que reaccionan con varios serovares. Este fenómeno, llamado reacción cruzada, se observa con frecuencia en la fase inicial de la enfermedad.

Después de la enfermedad aguda, los anticuerpos que presentan reacción cruzada desaparecen gradualmente en la medida que el sistema inmune “madura”, usualmente en el curso de semanas o meses, mientras que los anticuerpos específicos para serogrupos y serovares pueden persistir por años. Por tanto, los anticuerpos género específicos permanecen habitualmente detectables por meses y los anticuerpos serovar específicos por años. Reacciones

cruzadas débiles pueden ocurrir con otros grupos de microorganismos variando con el método serológico usado.

Ocasionalmente, los pacientes producen anticuerpos específicos que reaccionan solamente con antígenos ampliamente reactivos y poco o nada de anticuerpos serovar específicos puede ser detectado mientras otros pacientes, en cambio, pueden producir anticuerpos serovar específicos únicamente.

Generalmente, se cree que los anticuerpos serovar específicos son protectores y que un paciente es inmune a la reinfección con el mismo serovar mientras que la concentración (título) de anticuerpos sea lo suficientemente alta. Anticuerpos provocados por la infección con un serovar particular no necesariamente protegen contra la infección con otros serovares (OMS, 2008).

3.7 Diagnóstico

3.7.1 Métodos de diagnóstico directos

3.7.1.1 Microscopía de campo oscuro

Las *Leptospira* se encuentran por debajo del poder de resolución del microscopio óptico como consecuencia de su escaso grosor, por lo que no se puede visualizar

con facilidad a través de microscopía óptica convencional. Ni la tinción de Gram, ni la de plata son fiables para la detección de las *Leptospira*. La microscopía de campo oscuro es también relativamente poco sensible y puede dar lugar a hallazgos inespecíficos. Las preparaciones con anticuerpos marcados con fluoresceína se han usado para teñir las *Leptospira*, pero no se dispone de ellos en la mayoría de los laboratorios (Murray, 2009).

3.7.1.2 Aislamiento y cultivo de *Leptospira*

Para realizar el diagnóstico por aislamiento de la *Leptospira* es importante conocer su patogenia, porque dependiendo de la etapa evolutiva de la enfermedad así será la escogencia de la muestra a tomar así:

Leptospiremia: dura aproximadamente 7 – 10 días, en este momento la muestra adecuada para el diagnóstico es la sangre, hemocultivo; y en la etapa de leptospiruria que se presenta después de la anterior, se pueden aislar a partir de la orina de animales e incluso del hombre.

3.7.2 Métodos de diagnóstico indirectos

Son aquellos que reconocen la respuesta inmune (humoral o celular) por parte del huésped. Detección de anticuerpos específicos anti-leptospira por técnicas inmunológicas.

En el curso de una infección varían las poblaciones de anticuerpos frente al agente infectante. En una primera fase la clase predominante suele ser IgM, mientras que con el transcurso del tiempo las IgM disminuyen hasta desaparecer o quedar a baja concentración residual y, en cambio, aumentan las IgG. La búsqueda de anticuerpos clase IgM es de utilidad para hacer diagnóstico de infección reciente en una sola muestra de suero extraída en el período agudo de la enfermedad.

La búsqueda de anticuerpos clase IgG en una sola muestra se utiliza como técnica de tamizaje. Posteriormente los hallazgos positivos son confirmados en la misma muestra de suero por otra metodología.

La seroconversión es el aumento del título de anticuerpos cuatro veces o más observado en dos muestras pareadas de suero. La primera muestra se obtendrá en el período agudo de la enfermedad y la segunda, 15 a 21 días después de la primera, en el período de convalecencia, esta es útil para establecer el diagnóstico retrospectivo, pero no para el diagnóstico temprano de una infección, puesto que debemos esperar al período de convalecencia para obtener la segunda muestra del suero, por tanto este tipo de diagnóstico es útil para estudios epidemiológicos. Las diferencias de títulos deben ser mayores de cuatro veces para tener valor estadístico y se debería estudiar ambas muestras simultáneamente.

3.7.2.1 Técnicas serológicas

Un gran número de técnicas serológicas son usadas para el diagnóstico de la leptospirosis, cada una con su sensibilidad y especificidad propias (Postic et al., 2000). Frecuentemente es necesario usar varias técnicas, ya sea al mismo tiempo o sucesivamente, para alcanzar un diagnóstico confiable. El inmunoensayo enzimático o enzimoimmunoanálisis (ELISA) y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) son los métodos de laboratorio más comúnmente utilizados, se incluye también la inmunofluorescencia indirecta (IFI); sin embargo, la MAT, desarrollada por Martin & Petit (1918), sigue siendo el método de referencia.

La interpretación de los datos serológicos siempre se basa en el examen de muestras colectadas secuencialmente, p.ej. dos muestras obtenidas dentro de un período de tiempo mínimo de varios días después de la aparición de los síntomas, p.ej. 8 - 10 días. Una tercera muestra de suero podría ser necesaria para confirmar el diagnóstico clínico y el serogrupo infectante (OMS, 2008).

Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

La MAT se basa en la antigua prueba de lisis aglutinación desarrollada por Martín y Petit (1918) y modificada posteriormente (Borg-Petersen & Fagroeus, 1949; Carbrej, 1960; Cole et al., 1973; Postic et al., 2000, Schüffner & Mohtar, 1926;

Watt et al., 1988; Wolf, 1954). La noción de lisis después abandonada por considerarse una mala interpretación. La MAT permanece como prueba de referencia y es usada para detectar anticuerpos y determinar su título. Esta prueba puede ofrecer una indicación del serogrupo al cual pertenece el serovar infectante, pero raramente lo identifica. La MAT detecta tanto los anticuerpos tipo IgM como IgG. La prueba no puede ser estandarizada ya que utiliza antígenos vivos y factores como la edad y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación (Borg Petersen y Fargroeuus, 1949; Carbrey, 1960).

Las cepas aisladas localmente, que frecuentemente incrementan la sensibilidad de la prueba comparada con las cepas de referencia, también pueden ser incluidas en la batería de antígenos. Sin embargo, el rango de serovares no debería limitarse a cepas locales pues puede ser el caso de que la infección sea debida a serovares raros o quizás a una cepa que aún sea desconocida en la región afectada. Por esta razón también, debe incluirse una cepa saprofita (*L.biflexa* cepa Patoc 1), la cual reacciona con anticuerpos humanos generados por un número de serovares patógenos. También será necesario agregar otros serovares representantes de otros serogrupos no incluidos en la batería.

El uso de cepas bien caracterizadas es esencial para realizar la prueba de referencia correctamente. Deben realizarse regularmente las pruebas control, en

las cuales la actividad de la cepa se determina en relación con el antisuero específico de referencia o anticuerpos monoclonales, para verificar que no se ha fallado en la identificación de la cepa o que ha ocurrido una mezcla de antígenos.

Método e interpretación

Consiste en dos pasos sucesivos, llamados (1) tamizado; para determinar el(los) serogrupo(s) responsable(s); y (2) la MAT cuantitativa para determinar el título del suero haciendo diluciones seriadas al doble (2X) del suero para determinar el título de anticuerpos para cada uno de los antígenos positivos. No se debe usar un suero “lechoso” que contenga gotas de grasa.

MAT Cuantitativa

La MAT cuantitativa se lleva a cabo, haciendo diluciones seriadas al doble (2X) del suero para determinar el título de anticuerpos para cada uno de los antígenos positivos.

Interpretación

La MAT es usualmente positiva de 10 a 12 días después de la aparición de los primeros síntomas y signos clínicos, pero la seroconversión puede ocurrir, tan

pronto como 5-7 días después de la aparición de la enfermedad. La respuesta de anticuerpos puede ser retardada si se comienza la terapia con antibióticos antes de realizarse la prueba.

El umbral positivo o valor de corte de la reacción es fijado en 1/100 por parte de muchos laboratorios. Sin embargo, el título de anticuerpos debe ser interpretada a la luz de:

- la fecha de obtención de la muestra en relación con los primeros signos clínicos;
- la evolución de los títulos de anticuerpos entre las dos o tres muestras sucesivas;
- el serogrupo causal;
- el tratamiento dado.

Frecuentemente, se presentan co-aglutinaciones (reacciones cruzadas) en los sueros de pacientes con leptospirosis (Borg-Petersen, 1949; Kmety, 1957). Los anticuerpos que causan reacciones cruzadas, son los primeros que normalmente aparecen pero desaparecen rápidamente. Los anticuerpos homólogos, si bien aparecen un poco después, persisten por más tiempo, permitiendo la identificación presuntiva del serogrupo responsable de la infección y también la detección de rastros indicando infecciones previas (OMS, 2008).

Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Principio.

Si en el suero del paciente existen anticuerpos anti VIH, estos se unirán al antígeno viral que está en las células adheridas al portaobjeto. Este complejo es detectado mediante la adición de anti-inmunoglobulina humana conjugada con fluoresceína al pocillo. Finalmente la reacción es observada mediante un microscopio de fluorescencia. Es un procedimiento inmunológico que detecta tanto IgG como IgM emplea directamente como antígeno la cepa de *Leptospira* fijados a la preparación a la cual se agregan anticuerpos fluorescentes. Las moléculas de anticuerpo pueden volverse fluorescentes agregándoles un compuesto orgánico como, isotiocianato de fluoresceína. Las muestras se consideran positivas si se observa reactividad.

La IFI, es un método rápido y confiable para la determinación de anticuerpos antivirales en el suero del paciente. Se basa en la unión de anticuerpos antileptospira presentes en el suero del paciente a los antígenos de la *Leptospira* expresados en la superficie de la bacteria, que han sido fijadas a un portaobjeto de vidrio.

4.0 Objetivos

4.1 General

Determinar las infecciones con *Leptospira* spp en sueros de pacientes febriles de origen desconocido y con virus Dengue en Barranquilla

4.2 Específicos

4.2.1 Caracterizar geográfica y socioeconómicamente la procedencia de los pacientes con signos y síntomas compatibles con leptospirosis y fiebre dengue.

4.2.2 Comparar la técnica IFI con la prueba de oro (MAT) en el tamizaje de infecciones género específicas de *Leptospira* spp, en pacientes sospechosos de fiebre dengue.

4.2.3 Determinar el tipo de infección (reciente o pasada) en aquellos sueros /MAT/IFI género específico positivos.

4.2.4 Determinar el serogrupo de *Leptospira* spp patógena circulante en la población estudiada.

4.2.5 Determinar eventos de co-infecciones *Leptospira* spp/virus dengue en pacientes confirmados con fiebre dengue.

4.2.6 Describir la presentación clínica de las infecciones con leptospirosis, dengue o coinfección leptospirosis/dengue.

5.0 Materiales y Métodos

5.1 Tipo o nivel de la investigación.

Estudio descriptivo retrospectivo transversal

5.2 Población

5.2.1 Población Diana: Casos sospechosos de infección con virus dengue captados en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana en el años 2000, 2001 y 2008.

5.2.2 Población accesible: Casos sospechosos de infección con virus dengue, cuyas muestras y fichas clínicas están disponibles en el banco de sueros del Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte.

5.2.3 Población elegible: Se definen como criterios de inclusión y exclusión para constituir la población elegible los siguientes:

Criterios de inclusión:

Casos confirmados de infecciones con virus dengue por serología o por aislamiento viral, así mismo los casos de pacientes que no fueron diagnosticados como infecciones con virus dengue y que dispongan de muestras pareadas y

suficientes para realizar las pruebas para determinar infecciones con *Leptospira* spp.

Criterios de exclusión:

Casos de dengue confirmados o sospechosos que no tuvieran muestra pareadas o que no se dispusiera de muestras pareadas de volúmenes suficientes para correr las pruebas.

Se estudiaron sueros y fichas epidemiológicas (que contienen la información demográfica, socio-económica y clínica) provenientes de 86 pacientes , que acudieron a los centros de salud de los silos I y II (sistemas locales de salud) con sintomatología febril sospechosos de infección por el virus del dengue y cuyas muestras de suero pareados, fueron colectadas en el año 2000-2001 bajo un proyecto de investigación financiado por la Organización Mundial de la Salud (ID 990892: Dengue virus surveillance in the principal seaport and airport on the Atlantic Coast of Colombia) y con aprobación del comité de ética de la Universidad del Norte. Un número adicional de 12 sueros pareados de pacientes procedentes de los diferentes hospitales del Distrito de Barranquilla año 2008 (conservados a – 80°C en el laboratorio de enfermedades tropicales de la Universidad del Norte – Barranquilla) bajo un proyecto de investigación aprobado por COLCIENCIAS (ID: 1215-04-14364: Desarrollo de un método de diagnóstico simple, rápido y

económico para la serotipificación del virus del dengue basado en la glicoproteína viral no estructural-1 (NS-1). fueron también analizados.

5.3 Preparación de antígenos para las pruebas serológicas

5.3.1 Cultivo de Serovariedades de *Leptospira* spp

Se usaron 5 serovares de referencia internacional, incluidas 4 patógenas icterohaemorrhagiae, Faneii, Grippotyphosa y Canicola , detectadas como las más frecuentes en la ciudad y 1 saprófita *L.biflexa* serovar Patoc 1, las cuales fueron donadas por Herford Hospital *Leptospira* Reference Laboratory (Inglaterra) y mantenidas en el laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte.

5.3.2 Cultivo de *Leptospira biflexa* Semarang cepa Patoc 1.

La *L. biflexa* fue mantenida en medio de cultivo líquido EMJH (Elling-hausen-McCullough-Johnson-Harris-Becton-Dickinson-Biosciences) suplementado con 10% de medio de enriquecimiento comercial (Becton-Dickinson-Biosciences) y Fletcher, manteniéndose en cultivos continuos y a temperatura ambiente, (24°C) con 24 horas de crecimiento.

5.4 Pruebas serológicas de tamizaje

5.4.1 Prueba de microaglutinación (MAT)

Las muestras fueron procesadas por MAT para detectar anticuerpos anti-*Leptospira*. El antígeno fue la cepa *L. biflexa* Semaranga, serovar Patoc 1 mantenida en cultivo continuo en medio líquido EMJH, incubada a temperatura ambiente (24°C). Cuando alcanzó un crecimiento con una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland, se utilizó como antígeno para la prueba MAT.

La prueba se realizó según las recomendaciones de la OMS (WHO, 2003). Se hizo un tamizaje de género de todas las muestras de suero a evaluar a una dilución de 1:50 con la cepa *L. biflexa* Semaranga, serovar Patoc 1. Se consideraron como positivas todas las muestras que presentaron aglutinación del 50 al 75% de las *Leptospira* ssp en este tamizaje. La lectura se hizo en microscopio de luz marca Nikon con condensador de campo oscuro y con aumento de 20X. El título de anticuerpos se fijó en la dilución inmediatamente anterior a aquella en la cual la reacción de aglutinación se vio negativa.

Procedimiento:

Para la realización de la técnica se utilizaron 25µl de suero control positivo, 25µl de suero control negativo, 25µl de PBS (control de antígeno), 25µl de cada uno de los sueros pareados de los pacientes y a cada uno de ellos se le añadió 25µl de cepa *L. biflexa* serovar Patoc 1, y se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante dos horas, luego se pasaron 10µl a la placa de lectura, y se interpretó siguiendo el cuadro mostrado en la Tabla 1

Tabla 1. Cuadro base para la interpretación de resultados prueba MAT

Leptospiras libres	Leptospiras aglutinadas	Resultados	Interpretación
100%	0%	-	Negativo
75%	25%	+	Negativo
50%	50%	++	Positivo
25%	75%	+++	Positivo

5.4.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La prueba de IFI se desarrolló siguiendo el protocolo propuesto por Agudelo et al., 2006 y se estandarizó de acuerdo a la técnica de la OMS con algunas modificaciones, el antígeno se obtuvo de un cultivo de *L. biflexa* cepa Patoc1 de cuatro días de crecimiento, incubadas a una temperatura ambiente, hasta una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de MacFarland; luego se depositaron 10µl del cultivo en los círculos de los portaobjetos para IFI dejándose secar en el liofilizador . Luego se fijaron con acetona fría grado reactivo por 10 minutos y se guardaron a – 20°C.

Preparación de antilgM y antilgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína 1:1 en glicerol:

El antilgM conjugada se preparó rehidratando con 1ml de agua destilada y agregando 1 ml de glicerol. Luego se procedió a cubrir con papel aluminio y a guardar a El antilgG conjugada se rehidrató con 0.75 ml de agua destilada y 0.75 ml de glicerol. Se guardó a – 20°C cubriéndolo previamente con papel aluminio.

Titulación de anti-IgM y anti-IgG humanas:

La titulación de los anti-anticuerpos se realizó mediante la preparación de diluciones seriadas 1/100– 1/800 de anti-IgM y anti-IgG, utilizando suero control positivo y suero control negativo diluidos 1/100, se colocaron 25µl de los sueros controles en cada uno de los pozos de los portaobjetos para IFI, se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 30 min, se lavaron con PBS 3x/10min , luego se agregaron 25µl de las diferentes diluciones de anti-IgM y anti-IgG en cada pozo e incubaron en cámara húmeda durante 30 min 37°C, se lavó tres veces con PBS cada diez minutos y finalmente se hizo la lectura en microscopio fluorescente Nikon con un filtro 495 y aumento 40X, el título se define como la más alta dilución que presentó fluorescencia Las diluciones seleccionadas para la realización de la prueba fueron 1:200 para Anti IgM y 1:400 para anti IgG.

5.4.3 Tamizaje de sueros pareados de pacientes

Para la realización del tamizaje, se prepararon diluciones seriadas de los sueros pareados de los pacientes 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 y 1:2560, y se colocaron en cada uno de los pozos de los portaobjetos para IFI 25µl de cada una de las diluciones al igual que los controles positivo y negativo; se incubaron en cámara húmeda a 37°C, durante 30 min, lavaron con PBS 3x/10 min;

posteriormente se agregó 25µl de antilgM y antilgG titulado e incubaron en cámara húmeda a 37°C, durante 30 minutos, lavaron con PBS 3x/10min, y finalmente, lectura en microscopio fluorescente Nikon con un filtro 495 y aumento 40X, el título se define como la más alta dilución que presente fluorescencia, comparándola con el control positivo.

5.4.4 Prueba serológica para determinación de serogrupo patógeno circulante.

La determinación de los serogrupos se realizó utilizando las serovariedades *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Faneii y Canicola, en diluciones de 1/20 a 1/3200.

Procedimiento:

Para la realización de la técnica se utilizaron 25µl de suero control positivo, 25µl de suero control negativo, 25µl de PBS (control de antígeno), 25µl de cada uno de los sueros pareados de los pacientes y a cada uno de ellos se le añadió 25µl de cada una de las serovariedades y se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante dos horas, luego se pasaron 10µl a la placa y se llevó a cabo la lectura en microscopio de campo oscuro.

5.4.5 Determinación de co-infecciones *Leptospira* patógena y dengue.

Esta investigación se realizó con las muestras colectadas de pacientes que inicialmente fueron seleccionados como sospechosos de infecciones con el virus dengue; nuestro grupo de investigaciones confirmó infecciones con el virus del dengue ya sea por métodos serológicos en muestras pareadas y/o por aislamiento en un 33% de ellos. Es así que se quiso indagar sobre posibles co-infecciones con *Leptospira* spp patógena y analizar los signos y síntomas entre pacientes con dengue, con *Leptospira* y con co-infecciones leptospira/dengue, los cuales estuvieron disponibles en las fichas epidemiológicas de cada uno de ellos.

6.0. Consideraciones éticas.

El comité de ética de la Universidad del Norte aprobó los procedimientos para la toma de datos clínicos y muestras humanas de los proyectos: Organización Mundial de la Salud (ID 990892: Dengue virus surveillance in the principal seaport and airport on the Atlantic Coast of Colombia) y COLCIENCIAS (ID: 1215-04-14364: Desarrollo de un método de diagnóstico simple, rápido y económico para la serotipificación del virus del dengue basado en la glicoproteína viral no estructural-1 (NS-1). Los consentimientos informados por parte de los pacientes, cuyas muestras fueron analizadas, autorizan la utilización de estas muestras para estudios futuros incluyendo leptospirosis.

7.0 Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó con el paquete informático y estadístico de EPIINFO versión 3.5 en español y MedCalc versión 12. Se estimaron frecuencias, pruebas de Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo, estimando el respectivo intervalo de confianza y pruebas de concordancia. La asociación de variables se realizó con la Chi cuadrado.

Se consideraron positivos en la prueba de MAT los sueros de los pacientes que dieron positivos en la primera y segunda muestra o negativos en la primera muestra y positivos en la segunda muestra; mientras que en la prueba IFI (IgM) se consideraron positivos los sueros de los pacientes que dieron negativo en la primera muestra y positivos en la segunda, con un título de $\geq 1/40$; positivas ambas con un título de anticuerpos igual o en aumento y en la prueba IFI (IgG) negativa la primera, positiva la segunda muestra o positiva la primera y la segunda positiva con un título 4X el de la primera, considerándose en estos casos infección reciente. Los casos catalogados como infección pasada se considerados como negativos. (Tabla 2).

Tabla 2. Guía determinación casos positivos y negativos para MAT e IFI

Técnica		Positivos		Negativos	
		1ºMuestra	2ºMuestra	1ºMuestra	2ºMuestra
MAT		Positiva	Positiva	Negativa	egativa
		Negativa	Positiva		
IFI	IgM	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
		Positiva	POSITIVA=↑		
	IgG	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva
		Positiva	Positiva 4X		

8.0 Resultados

8.1 Aspectos sociodemográficos de las personas encuestadas

En total fueron estudiadas 98 personas, procedentes principalmente de Soledad (20,7%: 20/ 98), Simón Bolívar (14,3%: 14 /98), la Chinita (10,2%: 10/98), Rebolo (6,12%: 6/98), Las Nieves (5,1%: 5/98), Los Almendros (3,06% 3/98)), (Anexo 1). El 49% correspondió a hombres y el 51% a mujeres (Tabla 3). El promedio de edad de los participantes fue de 13,8, la edad máxima fue 74 años y la mínima de menos de 1 año (4 meses) (Tabla 4). Los oficios más comunes fueron: estudiante (48,0%: 47/98)), empleado (8%: 8/98)), ama de casa (7,1%: 7 /98), desempleado (3,0%: 3/98) (Tabla 5).

Tabla 3. Distribución por sexo

Sexo (población estudiada)			
Femenino		Masculino	
Nº	%	Nº	%
50	51	48	49

Tabla 4. Distribución por rangos de edad

Intervalos	Edad (Población Estudiada)	
	Nº	%
≥ 0 – 15	69	70,4
≥ 16 – 30	18	18,4
≥ 31 – 45	9	9,2
≥ 46 – 60	1	
≥ 6 - 75	1	1
TOTAL	98	100

Tabla 5. Distribución por ocupación

Ocupación	Nº	%
Desempleado	3	3,0
Empleo Formal	8	8,2
Estudiante	47	48 0
Hogar	7	7,1
Bebe	14	14,3
Sin dato	19	19,4
Total	98	100

8.2 Tamizaje de muestras pareadas por la prueba MAT e IFI

Al realizar el tamizaje a los sueros pareados con la prueba de MAT (Fig. 4 y 5) se obtuvo positividad en el 24,5% (24/98) (IC 95% 15.7 – 36.4) de los pacientes, mientras que con la técnica IFI un 39,8% (39/98) (IC 95% 28.3 – 54.4) (Tabla 6). (Fig. 6)



Fig 4. Preparación de cepario para la realización del MAT

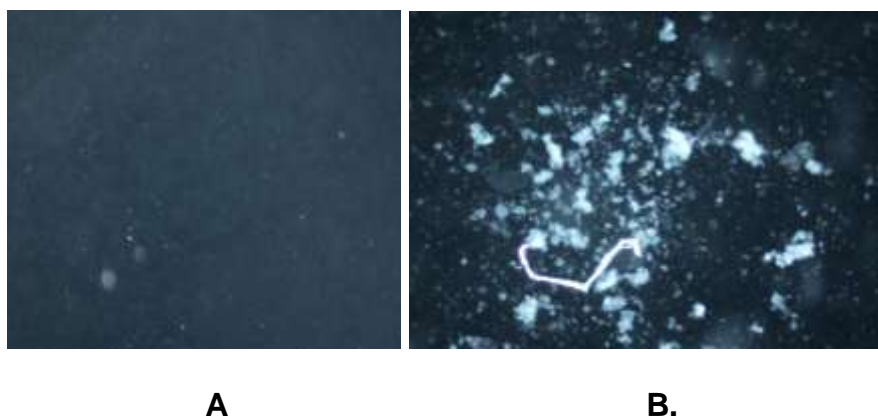


Fig 5. Leptospiras en microscopio de campo oscuro A. MAT control

Negativo: leptospiras libres y B. MAT control positivo: aglutinación $\geq 50\%$.



A

B

C

D

Fig 6. Preparación muestras A, sirviendo *L. biflexa* B, Lectura en microscopio de fluorescencia C y Control positivo de *Leptospira* ssp fluorescentes D.

Tabla 6. Tamizaje de sueros con MAT/IFI usando como antígeno *L. biflexa* serovar Patoc 1

Prueba	N°	%
MAT	24	24,5
IFI	39	39,8
Negativas	35	35,7
TOTAL	98	100

Al comparar las dos pruebas se encontró para la IFI, una sensibilidad del = 79,2% (57,9 – 92,9), E = 73% (61,4 – 82,7), VPP = 48,7% (32,4 – 65,2), VPN =

91,5% (81,3 – 97,3), (Tabla 7), obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa para la detección de positivos de la prueba IFI con respecto a la prueba oro ($\chi^2 = 18,44$, $p \leq 0,001$). Así mismo se realizó una prueba de concordancia obteniendo un valor moderado; *kappa* de 0.43.

Tabla 7. Comparación de pruebas MAT/IFI

		Prueba de Oro (MAT)		
IFI		+	-	
	+	19	20	39
	-	5	54	59
		4	74	98

Se consideró además, la segunda muestra como variable de resultado en la determinación de la S, E, VPP y VPN, estas cuatro pruebas se determinaron teniendo en cuenta primeras muestras con IgM e IgG positivas (Tablas 8 y 9) y segundas muestras con IgM e IgG positivas (Tablas 10 y 11):

Tabla 8. Sensibilidad y Especificidad de la primera muestra positiva con MAT y con IFI (IgM)

		MAT 1M	
		+	-
IFI 1M IgM	+	5	13
	-	8	73

(S = 38.5 (15.1 – 67.7); E = 84.9 (75.2 – 91.4), VPP = 27.8 (10.7 – 53.6), VPN = 90.1 (81.0 – 95.3);

Tabla 9. Sensibilidad y Especificidad de la primera muestra positiva con MAT y con IFI (IgG)

		MAT 1M	
		+	-
IFI 1M IgG	+	7	12
	-	6	74

(S = 53.8 (26.1 – 79.6), E = 86.0 (76.5 – 92.3), VPP = 36.8 (17.2 – 61.4),
VPN = 92.5 (83.8 – 96.9)

Tabla 10. Sensibilidad y Especificidad de la segunda muestra positiva con MAT y con IFI (IgM)

		MAT 2M	
		+	-
IFI 2M IgM	+	17	20
	-	6	56

S = 73.9 (51.3 – 88.9) E = 73.7 (62.1 – 82.8), VPP = 45.9 (29.8 – 62.9),
VPN = 90.3 (79.5 – 96.0). sirve como tamizaje.

Tabla 11. Sensibilidad y Especificidad de la segunda muestra positiva con MAT y con IFI (IgG)

		MAT 2M	
		+	-
IFI 2M IgG	+	10	13
	-	13	63

$S = 43.5 (23.9 - 65.1)$, $E = 82.9 (72.2 - 90.2)$, $VPP = 43.5 (23.9 - 65.1)$,
 $VPN = 82.9 (72.2 - 90.2)$.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos se expresa que la prueba IFI presenta mayor E (73,3 – 86,09) que S (38,5 – 73,9). Los valores predictivos positivos y negativos están en un intervalo de (27,8 – 45,9; 82,9 - 92,5) respectivamente.

Con relación a la Razón de Verosimilitud positiva refleja un estimado de 2,54
EDAD = Mediana = 10 casos (cuartil 1 = 4 año → P25; percentil 75 (cuartil 3 = 15 años) Moda = 10 años. Se utiliza la Mediana porque en los casos donde se realizan pocas observaciones la Media no se puede utilizar.

8.3 Determinación de infecciones recientes y pasadas por las pruebas MAT e IF

La prevalencia de infecciones con *Leptospira* patógena independientemente de si son infecciones recientes o infecciones pasadas fue del 21.4%(21/98) (IC 95% 13.3 – 32.8). Con relación al tipo de infección (reciente/pasada) se encontró que de los sueros MAT género específicos positivos el 58,3% (14/24) le correspondió a infecciones recientes y el 29,2% (7/24) a infecciones pasadas, mientras que de

los sueros IFI género específicos positivos el 74,4% (29/39) le correspondió a infecciones recientes y 25,6% (10/39) a pasadas (Tabla 12).

Tabla 12. Infecciones recientes y pasadas en los sueros MAT/IFI género específicos positivos.

	MAT		IFI	
	N°	%	N°	%
Infecciones recientes	14	58,3	29	74,4
Infecciones pasadas.	7	29,2	10	25,6
Otro	3	12,5	0	0
	24	100	39	100

Al comparar los resultados obtenidos en 17 pacientes que dieron positivos para las dos pruebas, obteniéndose una S = 91,0% (58,7 – 99,8), E = 55% (11,8% -88,2), VPP = 76,9% (46,2 – 94,9), VPN = 75% (19,4 – 99,4). , un Chi² de 1,7; p = 0,19 (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación infecciones recientes y pasadas en los sueros MAT/IFI género específicos positivos

		Prueba de Oro (MAT)		
		Recientes	Pasadas	
IFI	Recientes	10	3	13
	Pasadas	1	3	4
		11	6	17

8.4 Determinación de serovariedades patógenas de *Leptospira* spp circulantes en la población de estudio.

En general, la prevalencia de infecciones recientes y pasadas con serovariedades patógenas de *Leptospira* spp fue del 87,5% 21/24 (IC 95%) distribuidas de la siguiente manera (Tabla 14). La serovariedad más frecuente en las infecciones recientes fue la Icterohaemorrhagiae (42,9%)

Tabla 14. Serovariedades de *Leptospira* ssp patógenas/infecciones recientes

Paciente N°	Titulo S1	Titulo S2	Serogrupo
1	1/800	1/6400	Fanei
2	N	1/400	Icterohaemorrhagiae
3	N	1/800	Icterohaemorrhagiae
4	1/400	1/3200	Gripotypcosa
5	1/200	1/800	Icterohaemorrhagiae
6	1/100	1/400	Icterohaemorrhagiae
7	N	1/400	Gripotypcosa
8	N	1/400	Gripotypcosa y Canícola
9	N	1/400	Gripotypcosa
10	N	1/400	Icterohaemorrhagiae
11	N	1/400	Fanei y Grippotypcosa
12	N	1/400	Icterohaemorrhagiae
13	N	1/400	Grippotypcosa
14	N	1/400	Grippotypcosa

8.5 Determinación de Co-infecciones *Leptospira* /dengue.

Se observó además un 3,02% (3/98) de co-infección leptospirosis/febre dengue en la población estudiada. Los datos de serología corresponden a titulación de IgM e IgG por Elisa de captura y sus respectivos radios (Tabla 15).

Tabla 15. Co-infecciones *Leptospira* spp patógena y dengue

Paciente N°	Edad	Sexo	Día de colección de las muestras		Serología positiva para dengue	Aislamiento viral	Serogrupo de <i>Leptospira</i> spp		
							Títulos de <i>Leptospira</i> MATs		Serovariedad
			S1	S2			S1	S2	
1	15	M	2	15	Positiva	DEN - 1V	1:100	1:400	Icterohaemorrhagiae
2	2	M	26	6	Positiva	DEN - 4V	N	1:400	Grippotyphosa
3	12	F	6	18	Positiva	Negativo	N	1:800	Icterohaemorrhagiae

8.6 Caracterización clínica de pacientes con *Leptospira* spp, dengue, y co-infecciones.

En la Tabla 16, se muestran los síntomas más frecuentes, observados en la población total (98), siendo los más frecuentes fiebre (100%), dolor de cabeza (86%) y dolor corporal (70%).

Tabla 16. Síntomas más frecuentes observados en la población estudiada

Cefalea		Fiebre		Vómito/Naú seas		Dolor de ojos		Dolor corporal		Escalofrío	
N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
85	86	98	100	55	56	50	57	61	70	59	68

Sin embargo, al caracterizar por grupos de pacientes con diagnóstico confirmado: Leptospirosis, dengue y co-infecciones, observamos que los síntomas más frecuentes son por cada grupo de pacientes: 1) pacientes con leptospirosis fueron: fiebre (100%), seguido de cefalea, 85,7% y escalofrío (71,4%); 2) pacientes con dengue: fiebre (100%) , cefalea/dolor corporal (75% cada uno) y 3) en pacientes con leptospirosis/fiebre dengue (co-infección) se observó fiebre (100%), cefalea/vómito (83%) (Tabla 17) en pacientes sin diagnóstico se encontró: fiebre (94,3%), cefalea (88,6%), dolor corporal (62,9%) y escalofrío (60%).

Tabla 17. Síntomas más frecuentes en pacientes confirmados con leptospirosis, dengue, y co-infección

Síntomas	Fiebre dengue n = 20	Leptospiro sis n = 14	Co- infecciones n=3	Sin diagnósti co	Valores p			
					FD vs Lepto	FD vs co- infecciones	Lepto vs co- infeccio nes	Lepto vs sin diagnostico
Fiebre	20 (100%)	14 (100%)	3 (100%)	33 (64,3%)	NS	NS	NS	NS
Cefalea	15 (75%)	11 (78,6%)	3 (100%)	31 (86,6%)	NS	NS	NS	NS
Escalofrío	12 (60%)	10 (71,4%)	1 (33,3%)	21 (60%)	NS	NS	NS	NS
Vómito/naúseas	13 (65%)	7 (50%)	2 (66,6%)	16 (45,7%)	NS	NS	NS	NS
Dolor de ojos	12 (60%)	9 (64,3%)	1 (33,3%)	15 (42,8%)	NS	NS	NS	NS
Dolor corporal	15 (75%)	10 (71,4%)	1 (33,3%)	62,90%	NS	NS	NS	NS
Diarrea			2 (66,6%)		NS	NS	NS	NS

NS = No significativo

La mayoría de las personas que resultaron positivas para leptospirosis que participaron en el estudio habitaron los barrios de Soledad y Simón Bolívar (Tabla 18); en cuanto a sexo se registró un mayor número de casos positivos recientes en mujeres, (Tabla 19), con una comprendida entre 0 y 15 años (Tabla 20) y ocupación de estudiantes (Tabla 21) y ubicados principalmente en los estratos 1 y 2 (Fig. 7).

Tabla 18. Distribución de los casos positivos por barrios, estratos y serovares encontrados

Barrios	Estratos	N° (%)	Serovariedad
Soledad	1 y 2	3 (28,6)	Icterohaemorrhagiae x 2
			Grippotyphosa
Simón Bolívar	2 y 3	2 (14,3)	Icterohaemorrhagiae x 2
Rebolo	1 y 2	1 (7,14)	Fainei
Porvenir	4 y 5	1 (7,14)	Icterohaemorrhagiae
Alboraya	3	1 (7,14)	Grippotyphosa
Modelo	4	1 (7,14)	Grippotyphosa
La Luz	2	1 (7,14)	Icterohaemorrhagiae

Fig 7. Distribución de casos agudos de leptospirosis en Barranquilla

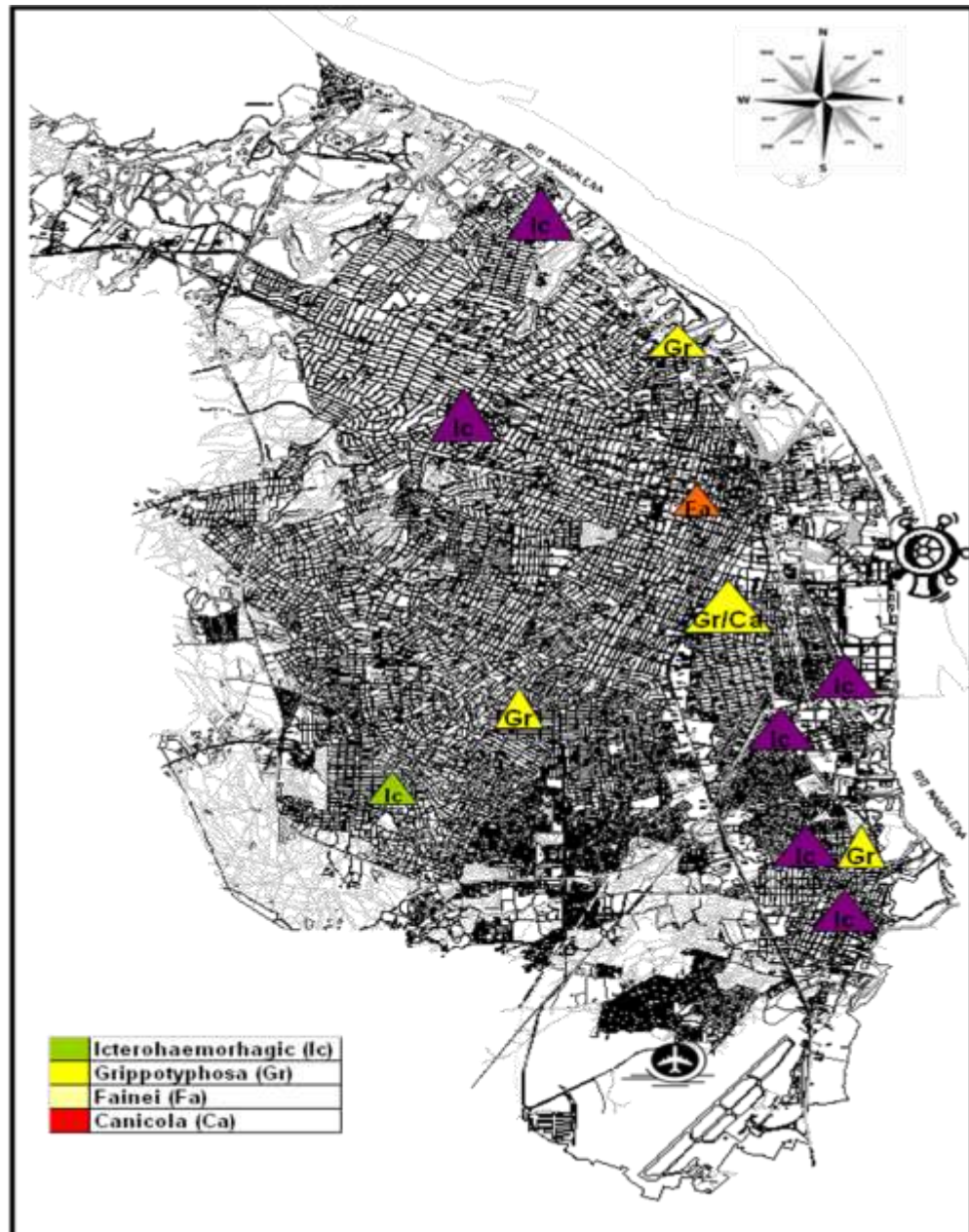


Tabla 19. Distribución de los casos positivos por sexo

Sexo	N°	%
Masculino	5	35,7
Femenino	9	64,3
Total	14	100

Tabla 20. Distribución de los casos positivos por rango de edad

Edad (intervalos)	N°	%
≥ 0 - 15	9	64,3
≥ 15 - 30	3	21,4
≥ 30 - 45	2	14,3
≥ 45 - 60	0	0
Total	14	100

Tabla 21. Distribución de los casos positivos por ocupación

Ocupación	N°	%
Estudiantes	5	35,7
Sin dato	3	21,4
Empleado	2	14,3
Hogar	2	14,3
Bebé	1	7,1
Ninguna	1	7,1

9.0 Discusión

Se estudiaron 98 pacientes sospechosos de infección con virus del Dengue, procedentes de varios SILOS y residentes en los diferentes barrios de la ciudad de Barranquilla del Departamento del Atlántico, con fin de comparar dos técnicas diagnósticas (MAT e IFI), para lo cual se utilizó un tipo de estudio de pruebas múltiples en paralelo, porque ambas pruebas se aplicaron simultáneamente a la misma muestra de individuos, de tal forma que se consideran negativos aquellos sujetos en los que se obtienen resultados negativos en las dos pruebas y positivos todos los demás.

La mayoría de las personas que participaron en el estudio habitaron los barrios de Soledad, Simón Bolívar , Chinita, Rebolo y Las Nieves, que fueron los que mayor número de casos positivos de leptospirosis presentaron; estos barrios pertenecen a los estratos 1 y 2, donde las condiciones sanitarias son más deficientes y se encuentran localizados cerca de basureros y arroyos, condiciones que aumentan la probabilidad de presencia de roedores en las casas, siendo las ratas uno de los principales reservorios urbanos e esta bacteria (Murray, 2009; International Leptospirosis Society, 2011).

Se conoce que la frecuencia de la leptospirosis en hombres es mayor que en mujeres y esto se explica muy probablemente por las diferencias existentes entre

las actividades realizadas por unos y otros, sin embargo al comparar la variable sexo se encontró un χ^2 de 1,26 y una $p = 0,26$ lo que indica que no es estadísticamente significativa, lo anterior se confirmó en este trabajo, a pesar que la mayoría de los casos positivos se presentaron en personas con edades comprendidas >0 – 15 años y estudiantes, la edad y la ocupación no son estadísticamente significativas (χ^2 1,5092;; valor p de 0,82 50; <5).

Al realizar el tamizaje a las 98 muestras de sueros pareados se encontró mayor proporción de sueros género específicos positivos con la prueba IFI entendiéndose que la IFI nos puede estar detectar falsos positivos: por tanto esta prueba se debe utilizar como prueba confirmatoria y no como prueba de tamizaje. Adicionalmente, se puede utilizar cualquiera de las dos pruebas para determinar infecciones recientes y pasadas, y orientar el tratamiento del paciente. Sin embargo, al utilizar la prueba MAT para dar respuesta a esta pregunta, se requiere del mantenimiento de cultivos con varias serovariedades, representando un costo alto para la ejecución de la prueba, mientras que con la IFI, podemos titular anticuerpos IgM e IgG usando la *leptospira* saprófita, de uso recomendable ya que no es patógena. Por otro lado, con la IFI no podemos determinar serogrupo o serovariedad patógena, lo cual tiene un valor epidemiológico porque nos orienta a la detección de fuentes de infección (reservorios).

En este estudio se demuestra una seroprevalencia general del 24,5% de leptospirosis en Barranquilla, probablemente por las deficientes condiciones higiénicas; y una seroprevalencia no muy menor del 21,4% con serovariedades patógenas ya sea en infecciones recientes o pasadas. Esta seroprevalencia es importante porque la leptospirosis se ha considerado por mucho tiempo como una zoonosis rural, pero en los últimos tiempos como es nuestro caso se observa un cambio en la epidemiología de la enfermedad. Los casos de leptospirosis cursaron como una dengue clásico, sin gravedad e inclusive en los casos de co-infección, ratificando la hipótesis de que existe subnotificación de casos de leptospirosis humana en Barranquilla y las dificultades en la diferenciación clínica entre dengue, leptospirosis, malaria, fiebre tifoidea, Hantavirus entre otros; para determinar la ocurrencia real de esta enfermedad , se debe realizar un diagnóstico diferencial entre estas patologías, especialmente de dengue/leptospira en Barranquilla, ya que es un área endémica.

Las serovariedades mas frecuentes encontradas en este estudio: Icterohaemorrhagiae, Faneii, Grippotyphosa y Canicola están asociadas a roedores, caninos y marsupiales (Acha et al 1986), este último frecuentemente encontrado en la ciudad.

Con relación a la coinfección leptospira/dengue (Crociani, 2010) se encontró 3,02% (3/98), lo anterior nos permite resaltar la importancia que tiene realizar a los pacientes con síndrome febril agudo no solo las pruebas para diagnosticar dengue, sino también contra la leptospirosis, para evitar las complicaciones que se presentan cuando estos dos microorganismos infectan al mismo tiempo a un paciente, incrementando la tasa de mortalidad.

Los signos y síntomas más frecuentemente encontrados en los pacientes que presentan síndrome febril: fiebre, cefalea, escalofrío, vómito, dolor corporal y dolor ocular nos indica la importancia de realizar un diagnóstico diferencial, entre las enfermedades endémicas de la región, principalmente leptospirosis y fiebre dengue ya que por síntomas es imposible discriminarlos en el curso inicial de la enfermedad. La caracterización de los síntomas encontrados en la gran mayoría de los pacientes seropositivos para *Leptospira*, concuerda con las manifestaciones de una leptospirosis febril leve y no una enfermedad sistémica grave (Enfermedad de Weil), lo anterior se debe posiblemente al número de microorganismos implicados en la infección, al estado inmunitario del huésped, o a la virulencia de la cepa infectante.

Los principales síntomas que se presentaron en los pacientes seropositivos para leptospirosis fueron en orden descendente fiebre, cefalea y escalofrío, mientras que

para coinfección leptospirosis/fiebre dengue fue, fiebre, cefalea y vómito y para los seropositivos para fiebre dengue fue fiebre, cefalea y dolor corporal, no observándose ningún síntoma característica que permita realizar diagnóstico clínico diferencial. Si se tienen en cuenta los estudios realizados en otras zonas de dengue endémico que han demostrado que la leptospirosis puede ser confundida con la fiebre del dengue (10-12), estos apoyan los resultados encontrados. La mayoría de los síntomas clínicos de la leptospirosis son inespecíficos y no se distinguen de los síntomas asociados con la fiebre del dengue u otros síndromes febriles. Aunque la fiebre en los pacientes con leptospirosis es más alta y de mayor duración que en los pacientes con dengue, son suficientes los hallazgos clínicos para que los médicos mantengan un alto índice de sospecha de ambas enfermedades, en especial durante la estación de máxima incidencia como son las temporadas lluviosas. La determinación de la leptospirosis es especialmente importante, porque la utilización de agentes antimicrobianos puede reducir la severidad y duración de la enfermedad.

10.0 Conclusiones

La leptospirosis es una zoonosis endémica en la Región del Caribe Colombiano. Se presenta con mayor frecuencia según este estudio en su forma benigna (anictérica), y se relaciona con la época de lluvias, esto propicia confusión con otros padecimientos febriles como es el dengue, por lo que se sugiere sea considerada dentro del diagnóstico diferencial.

La IFI es una alternativa que complementa el diagnóstico de leptospirosis y los estudios seroepidemiológicos, por ser más específica que sensible, lo que permite su utilización como prueba confirmatoria y como indicadora de inicio de tratamiento, mas no aporta información epidemiológica. La presencia de anticuerpos contra la *Leptospira* en las muestras de los pacientes sospechosos de fiebre dengue del estudio, indica que la Leptospirosis es una de las causas del síndrome febril que el clínico debe explorar.

La seroprevalencia de leptospirosis en los pacientes sospechosos de infección por dengue es alta en el grupo de pacientes estudiados. Los serogrupos más frecuentemente encontrados fueron Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa en pacientes con infecciones recientes los que indica la importancia de roedores y marsupiales en la transmisión de esta bacteria en la ciudad, especialmente en los estratos socio-económicos bajos; estas serovariedades están altamente

relacionadas con roedores (*Rattus spp*) y marsupiales, en Barranquilla, es frecuente encontrar *Didelphis marsupialis* (Zorrochucho) en nuestros patios.

El alto porcentaje encontrado de coinfección leptospira-dengue, proporciona una alerta a los integrantes del área de la salud, para que en zonas endémicas a todos los pacientes que presenten síndrome febril se le realicen pruebas tanto de leptospirosis como de dengue, para evitar la alta mortalidad que se presenta en los pacientes con ambas enfermedades, pero sin diagnóstico de leptospirosis, lo que impide instaurar tempranamente el tratamiento con antibióticos.

Se debe monitorear en la región la presencia de aguas contaminadas con orina de estos animales junto con la presencia de basuras, para intentar reducir la exposición ambiental de la población. Es necesario también promover campañas de vacunación contra *Leptospira* en los caninos y regular la población de perros callejeros existentes en la zona. El riesgo de exposición en las ciudades es importante, debido a las condiciones precarias de vida y de higiene en los domicilios y en su ambiente circundante, que favorecen la presencia de roedores y de animales domésticos con bacteriuria. El agua es esencial para la supervivencia de *Leptospira*, por lo tanto es de esperarse un aumento de su frecuencia en épocas de abundantes lluvias (Nardone et al, 2004).

11.0 Bibliografía

Acha N, P; Szyfres Boris. . **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales: Parasitosis**. 3° ed. Vol. 3. OPS/OMS Washington, D,C, 20037 EUA, 2003.

Acosta H, Moreno Ch; Viáfara D. **Leptospirosis**. Revisión de temas. Colombia Médica. 1994;25: 36 – 42.

Agudelo, F. P; Arboleda M; Carrero S; Cartagena G; Restrepo B. **Coinfección Leptospira – Dengue, Brote Epidémico Urabá Antioqueño, Colombia, 2006**. Memorias II Simposio Nacional de Virología. Septiembre 7 – 9. Bogotá Colombia. 2006.

Agudelo-Flórez P; Restrepo M; Lotero M.A. **Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana**. Biomédica 2006; 26:216-23.

Alexander, A. D. 1991. **Leptospira**, en **Manual of Clinical Microbiology**, 5ª ed., A. Balow, W. J. Hausler, K. L. Herman, H. D. Isenberg, H. J. Shadomy, Editores, American Society for Microbiology, Washington, pp. 554-559.

Alfaro, C; Clavijo A; Aranguren Y; De Rolo M; Valle, A.. **Epidemiología de la leptospirosis en sistemas bovinos doble propósito del estado Monagas. I. Localidad y manejo.** *Zootecnia Trop.* [online]. Sep. 2007, vol.25, no.3 [citado 10 Noviembre 2008], p.189-192.

Braselli, Adelina. **Leptospirosis.** Uruguay.

<http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm>.

Bravo C; Restrepo M; Robledo C. **Leptospirosis.** *Antioquia Médica.* 1998; 6: 475 – 479.

Carneiro Marcelo; Giacomini, M; Costa, M. **Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: Estudio clínico y epidemiológico: Experiencia Clínica.** *Rev Chil Infect* 2004; 21 (4): 339-344.

Céspedes Z, Manuel; Gienny A, M; Vidal A; Balda A; Suarez, V. **Prueba de Elisa indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana.** *Rev. Peruana de medicina experimental y salud publica* v.19 n.1 Lima ene./mar 2002.

Céspedes, Manuel; Chun, Magali; Cano, Edith; Huaranca, Ivonne; Atoche, Hidalgo; Ortiz, Hugo; Valentín, Mirtha; Balda, Lourdes; Huamán, Teresa. **Prevalencia De Anticuerpos Contra Leptospira En Personas Asintomáticas y En Perros De Chancay, Lima 2001.** Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2007; 24(4): 343 – 49.

Crociati Meguins, Lucas; Honório Onofre de Medeiros Júnior. **Coinfección por leptospirosis y dengue en un paciente de la Amazonía brasileña.** Rev Pan-Amaz Saude v.1 n.4 Ananindeua dic. 2010.

Cruz M, Rollin, Fernandez V, Freddy y Arevalo R, Heriberto. **Hiperendemicidad de leptospirosis y factores de riesgo asociados en localidades arroceras del departamento de San Martín - Perú.** *Rev. perú. med. exp. salud publica.* [online]. ene./mar 2002, vol.19, no.1 [citado 10 Noviembre 2008], p.10-16.

Cullen, P; Cordwell, S; Bulach D; Haake D; and Adler B. **Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai.** Rev. Infection Immunology. 2002 May;70(5): 2311 – 18.

Cullen P; Xu Xiaoyi ; Matsunaga J ; Sanchez Y ; Ko A ; Haake D ; Adler B.
Surfaceome de Leptospira spp. Rev. Infection Immunology 2005. Aug;73(8):4853
– 63.

García, Rodríguez Eddy; Suárez Hernández, Miguel; García Pérez, Reinaldo
Pablo; García Cabrera, Rafael; Pedroso Fernández, Seferino et al. **Factores de
riesgo de la leptospirosis humana en el Municipio Ciego de Ávila.** Revista
Cubana de Higiene y Epidemiología. Vol 39. Nº3. Sept – Dic 2001.

González O. Ginebra. **Leptospirosis. Estudio seroepidemiológico en
humanos.** Trabajo para optar por el título de Especialista de I Grado en
Microbiología; Ciudad de La Habana, INHEM, 1994.] [Ministerio de Salud Pública.
Programa Nacional de Control de la Leptospirosis Humana. Ciudad de La Habana,
1997].

Haake D; Matsunaga J. **Characterization of the Leptospiral Outer Membrane
and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins.** Revista
Infection Immunology. 2002 Sep; 70(9):4936 – 4945.

Laguna Torres Víctor Alberto. **Leptospirosis.** Oficina General de Epidemiología /
Instituto Nacional de Salud. Ministerio De Salud Del Perú. Lima. 2000.

Levett P.N, Rama S.L, Edwards C.N. **Detección de infección por dengue en pacientes en los pacientes investigados por leptospirosis en Barbados.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000 jan; 61(1):112.

López E ; Moros, R ; Cardona, M ; Zambrano, J; Morón, D ; Hernández, R; Alarcón, V; Toro, E; Monsalve, I; Pérez, J; Hernández, R. **Hallazgo de infecciones concomitantes leptospira-fiebre amarilla y leptospira-dengue en casos de pacientes fallecidos con síndrome febril icterohemorrágico en Venezuela años 2003 – 2004.** VI Congreso Venezuela de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de infecciones de transmisión sexual. 15 – 18 Mayo de 2005. Caracas Venezuela.

Macedo A. Sonia. **Estudio ultraestructural de L. biflexa serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido.** Rev. Perú Med. Esp. Salud Pública. 22(4); 2005.

Macías, J. Vergara, Romero, C, Falconar, C, A. **Comportamiento de la leptospirosis en el Departamento del Atlántico. Colombia. Salud Uninorte. Barranquilla.** 2005.20: 18 – 29.

Madigan M; Martinko J (editors). (). *Brock Biology of Microorganisms*, 12th ed., Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.2009.

Miranda JL, Conde E, Sánchez I, Martinez P, Ríos R, Gainer A, Hernández R, Kerguelen H, Arrieta G, Sánchez P, Mattar S et al. Estudio de un brote de fiebre desconocida en el municipio de Chimà. *Biomèdica*, 2003; 23:195.

Murray K; Rosenthal K; Pfaller M. **Microbiología Médica**. 6^a edición. Elsevier S.A. Madrid España. 2009.

Nájera Saholet; Alvis Nelson; Babilonia David; Alvarez Ligia; Máttar Salim. **Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano**. Salud pública Méx. vol.47 no.3 Cuernavaca May/Jun 2005.

Nardone A, Capek I, Baranton G, Campese C, Postic D, Vaillant V, et al. **Risk factors for leptospirosis in Metropolitan France: results of a national case-control study**, 1999-2000. *Clin Infect Dis* 2004; 39:751-3.

Navarrete-Espinosa J; Acevedo-Vales J; Huerta-Hernández E; Torres-Barranca J; Gavaldón-Rosas D. **Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz**. *Salud Pública de Mexico*. ISSN 0036-3634, Vol. 48, N°. 3, 2006 , pags. 220-228.

Oficina General De Epidemiología (OGE), Instituto Nacional De Salud (INS).

Ministerio De Salud Del Perú. Lima 2000.

Organización Mundial de la Salud. **Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control.** / Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 2008. 127p.: il. (Serie de Manuales Técnicos, 12) Traducción de: Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.

Parra, B; Rengifo G; Astudillo M; Corral R; Muñoz E; Barona G. **Infecciones mixtas por virus del dengue y *Leptospira* en pacientes con enfermedad moderada a grave en el Valle del Cauca.** Biomèdica 2003; 1:201.

Pérez-García JA. **Hallazgos histopatológicos en necropsias de leptospirosis.** Colombia Médica 1997; 28: 4- 9.

Ratram S. **A manual on leptospirosis A hazardous disease of pet and dear.** Tamilnada Veternary and Animal Sciences University. Madras. S. R. Publications, 1994.

Rele M.C; Rasal A; Despande S.D; Koppikar G.V; Lahiri K.R **Infección mixta debido a la *Leptospira* y el Dengue**. Indian J. Med. Microbiol. 2001, Oct-Dec; 19(4): 206.

Roca Goderich R. **Leptospirosis**. En: Temas de Medicina Interna. La Habana: Editorial Científica-Técnica, 1989;t 3:471-6.

Rollin Cruz M; Freddy Fernández V; Heriberto Arévalo. **Hiperendemicidad De Leptospirosis Y Factores De Riesgo Asociados En Localidades Arroceras Del Departamento De San Martín – Perú**. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002, 19 (1).

Sacsaquispe C, Rosa, Glenney A, Martha y Cespedes Z, Manuel. **Estudio preliminar de leptospirosis en roedores y canes en salitral, Piura-1999**. Rev. Perú. med. exp. salud pública. [online]. ene./mar. 2003, vol.20, no.1 [citado 19 Noviembre 2007], p.39-40.

Savio, María, Lindner, Cristina. **Situaciones de riesgo, Vigilancia, Reservorio y fuente de infección de la leptospirosis. Guía manejo y Control de la leptospirosis**. Ministerio de Salud Pública. Uruguay. 2002.

Seijo Alfredo. **Leptospirosis como problema de Salud Pública**. Publicaciones en conjunto con el hospital Muñiz. Argentina.

Silva, R F. Riedemann, S. **Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta**. Arch. Med. Vet. 39, N° 3, 2007.

Troyes Lucinda R; Fuentes L; Troyes M; Canelo L; García M; Anaya E; Tapia R; Céspedes M. **Etiología del síndrome febril agudo en la provincia de Jaén, Perú 2004-2005**. Rev. Perú. med. exp. salud pública v.23 n.1 Lima ene.-mar. 2006.

Valera Antequera, Danik. Subdirectora Vigilancia y Control en Salud Pública. **PROTOCOLO DE VIGILANCIA PARA LEPTOSPIROSIS. INS**. Colombia. Abril, 2010.

VII Reunión de la International leptospirosis Society. Escuela de Medicina Unam. 2011.

World Health Organization. International Leptospirosis Society. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control 2003**.

[Consultado: 05/05/2005]. Disponible en:

<http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ilspage.htm>.

ANEXOS

ANEXO 1

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS PACIENTES INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO

PACIENTES	SEXO	EDAD	OCUPACIÓN	BARRIO	PACIENTES	SEXO	EDAD	OCUPACIÓN	BARRIO
1	F	20A	ESTUDIANTE	VILLA SANTOS	23	M	15A	ESTUDIANTE	COSTA HERMOSA
2	F	4A	ESTUDIANTE	EL BOSQUE	24	F	13A	SIN DATO	REBOLO
3	F	14A	ESTUDIANTE	COUNTRY CLUB VILLA	25	M	13A	ESTUDIANTE	LAS NIEVES
4	M	30A	DESEMPLEADO	GALÁN	26	M	10A	ESTUDIANTE	B. DEL RÍO
5	F	37A	AMA DE CASA	LUCERO	27	F	10A	ESTUDIANTE	NUEVA COLOMBIA
6	F	21A	AMA DE CASA	SANTO DOMINGO	28	F	9A	SIN DATO	SAN FELIPE
7	M	15A	ESTUDIANTE	LAS AMÉRICAS	29	F	1A	BEBÉ	LAS NIEVES
8	M	15A	ESTUDIANTE	NUEVO MILENIO SOLEDAD	30	M	22A	SIN DATO	LA CHINITA
9	F	6A	ESTUDIANTE	LOS GIRASOLES	31	F	9A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR
10	M	21A	ESTUDIANTE	NORMANDÍA (SOLEDAD)	32	M	2A	BEBÉ	COSTA HERMOSA
11	M	17A	ESTUDIANTE	SALAMANCA	33	F	2A1/2	BEBÉ	CHINITA
12	M	15A	NINGUNA	LA LUZ	34	F	15A	ESTUDIANTE	REBOLO
13	M	37A	SISTEMAS	SAN SALVADOR	35	F	7M	BEBÉ	LAS NIEVES
14	M	14A	ESTUDIANTE	REBOLO	36	M	25A	SIN DATO	LAS NIEVES
15	M	10A	ESTUDIANTE	LA CHINITA	37	F	1A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR
16	M	2A	BEBE	SIMÓN BOLIVAR	38	M	10A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR
17	F	8A	SIN DATO	LOS LAURELES	39	F	12A	ESTUDIANTE	PRIMERO DE MAYO
18	M	4A	ESTUDIANTE	BELLA ARENA	40	F	7A	ESTUDIANTE	LAS GAVIOTAS
19	F	6A	ESTUDIANTE	LA CHINITA	41	F	9A	ESTUDIANTE	REBOLO
20	F	18A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR	42	M	2A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR
21	M	34A	ADM DE ESTANCO	MONTES	43	M	12A	ESTUDIANTE	LA LUZ
22	M	9A	ESTUDIANTE	SOLEDAD 2000	44	F	11A	ESTUDIANTE	FERRY

PACIENTES	SEXO	EDAD	OCUPACIÓN	BARRIO	PACIENTES	SEXO	EDAD	OCUPACIÓN	BARRIO
45	M	15M	BEBE	CONCORDIA	67	F	17A	ESTUDIANTE	GIRASOLES
46	F	33A	HOGAR	REBOLO	68	F	16A	HOGAR	SIMÓN BOLIVAR
47	F	10M	BEBE	CHINITA	69	F	27A	ASCENSORISTA	VILLA ANGELA
48	F	21A	QUIM. FARMAC	HIPODROMO	70	M	14A	ESTUDIANTE	FERRY
49	M	12A	ESTUDIANTE	REBOLO	71	F	5A	SIN DATO	CIUDADELA 20 DE JULIO
50	M	5A	ESTUDIANTE	LAS MORAS	72	M	2A	BEBÉ	PRIMERO DE MAYO
51	M	40A	ELECTRICISTA	COSTA HERMOSA	73	M	8A	ESTUDIANTE	LAS NIEVES
52	F	3A	SIN DATO	SOLEDAD	74	F	44A	AMA DE CASA	CHINITA
53	M	15A	SIN DATO	SOLEDAD	75	F	40A	AMA DE CASA	CENTRAL DE SOLEDAD
54	F	8A	SIN DATO	DON BOSCO	76	F	40A	SIN DATO	ALMENDROS
55	F	4A	SIN DATO	ALMENDRO	77	F	16A	SIN DATO	ALMENDROS
56	M	30A	CELADOR	3 AVEMARÍA	78	F	12A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR
57	F	49A	HOGAR	DON BOSCO	79	F	16A	ESTUDIANTE	CHINITA
58	M	4A	SIN DATO	TRIUNFO-SOLEDAD	80	F	19A	CESANTE	PALERMO
59	M	12A	ESTUDIANTE	CHINITA	81	F/M	2A	BEBÉ	SANTA HELENA
60	F	16M	BEBÉ	CENTRAL	82	M	2A	BEBÉ	SIMÓN BOLIVAR
61	M	9A	SIN DATO	CIUDADELA METROPOLITANA	83	M	10A	SIN DATO	SIMÓN BOLIVAR
62	M	4M	BEBÉ	SIMÓN BOLIVAR	84	M	15M	BEBÉ	URBANIZACIÓN EL PARQUE
63	M	9A	SIN DATO	GALAN	85	F	11A	ESTUDIANTE	SOLEDAD
64	M	6M	BEBE	CHINITA	86	F	10A	ESTUDIANTE	SOLEDAD 2000
65	F	44A	AUXILIAR ENF	OLIVOS	87	M	6A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR
66	F	6A	ESTUDIANTE	SIMÓN BOLIVAR	88	F	5A	ESTUDIANTE	HIPODROMO

PACIENTES	SEXO	EDAD	OCUPACIÓN	BARRIO
89	M	26A	CONDUCTOR	SIMÓN BOLIVAR
90	F	5A	ESTUDIANTE	SAN SALVADOR
91	M	5	SIN DATO	PORVENIR
92	M	11A	SIN DATO	PORVENIR
93	M	5A	ESTUDIANTE	CHINITA
94	M	11A	ESTUDIANTE	CHIQUEQUIRA
95	M	5A	ESTUDIANTE	VILLA KATANGA
96	M	7A	ESTUDIANTE	ALBORAYA
97	F	21A	ESTUDIANTE	MODELO
98	F	74A	SIN DATO	RECREO

ANEXO 2

RESULTADOS DEL TAMIZAJE CON *L.biflexa* SEROVAR PATOC MEDIANTE LAS TECNICAS DE MAT E IFI

PACIENTES	MAT*		INTERPRETACIÓN MAT	IFI				INTERPRETACIÓN IFI	PACIENTES	MAT*		INTERPRETACIÓN MAT	IFI				INTERPRETACIÓN IFI
	1ª M	2ªM		IgM		IgG				IgM			IgG				
				1ºM	2ºM	1ºM	2ºM			1ºM	2ºM		1ºM	2ºM			
1	N	N	N	N	P	N	P	P	22	P	P	P	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	P	23	N	N	N	N	P	N	P	P
3	N	N	N	N	N	N	N	N	24	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	P	P	P	P	P	25	N	N	N	N	N	N	N	N
5	P	P	P	N	P	N	P	P	26	N	N	N	N	P	N	N	P
6	N	N	N	N	N	N	N	N	27	N	N	N	P	P	P	P	P
7	N	N	N	N	N	N	N	N	28	N	N	N	N	N	N	N	N
8	P	P	P	N	P	N	P	P	29	N	N	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	P	P	P	P	P	30	N	N	N	N	N	N	N	N
10	P	P	P	P	P	P	P	P	31	N	N	N	N	N	N	N	N
11	P	P	P	N	P	P	P	P	32	N	N	N	N	N	N	N	N
12	P	P	P	N	P	N	N	P	33	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N	N	N	34	N	N	N	P	N	P	N	P
14	N	N	N	N	P	N	N	P	35	N	N	N	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P	P	P	P	36	N	N	N	P	P	P	P	P
16	N	N	N	N	N	N	N	N	37	N	N	N	N	N	N	N	N
17	N	P	P	N	N	N	N	N	38	N	N	N	N	N	N	N	N
18	P	P	P	P	P	P	P	P	39	N	N	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	P	N	P	P	40	N	N	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N	N	N	N	N	N	41	N	N	N	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	N	P	P	P	42	N	P	P	N	P	N	N	P

PACIENTES	MAT*		INTERPRETACIÓN MAT	IFI				INTERPRETACIÓN IFI	PACIENTES	MAT*		INTERPRETACIÓN MAT	IFI				INTERPRETACIÓN IFI
	1ª M	2ªM		IgM		IgG				1ª M	2ªM		IgM		IgG		
				1ºM	2ºM	1ºM	2ºM						1ºM	2ºM	1ºM	2ºM	
43	N	N	N	N	N	N	N	N	64	N	N	N	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N	N	N	N	65	N	N	N	N	N	N	N	N
45	P	P	P	N	P	N	N	P	66	N	N	N	N	N	N	N	N
46	N	P	P	N	P	N	N	P	67	N	N	N	N	N	N	N	N
47	N	N	N	N	N	N	N	N	68	N	P	P	N	N	N	N	N
48	N	P	P	N	N	N	N	N	69	N	P	P	N	P	N	N	P
49	N	N	N	P	P	N	N	P	70	N	N	N	N	N	N	N	N
50	N	N	N	N	N	N	N	N	71	N	P	P	P	P	N	N	P
51	N	N	N	P	N	N	N	N	72	N	N	N	N	N	N	N	N
52	N	N	N	N	N	N	N	N	73	N	N	N	N	N	N	N	N
53	N	N	N	N	N	N	N	N	74	N	P	P	N	N	N	N	N
54	N	N	N	N	N	N	N	N	75	N	N	N	N	N	N	N	N
55	N	N	N	N	N	N	N	N	76	N	N	N	N	N	N	N	N
56	N	N	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	N	N	N	N	N
57	N	N	N	P	P	P	P	P	78	N	P	P	P	P	N	N	P
58	N	N	N	N	N	N	N	N	79	N	N	N	N	P	N	N	P
59	N	N	N	N	N	N	N	N	80	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	81	N	N	N	N	N	N	N	N
61	N	N	N	P	P	P	P	P	82	N	N	N	N	N	N	N	N
62	N	N	N	N	P	N	N	P	83	N	N	N	P	P	N	N	P
63	N	N	N	N	N	N	N	N	84	N	N	N	N	P	N	N	P

P= Positivo N=Negativo

PACIENTES	MAT*		INTERPRETACIÓN MAT	IFI				INTERPRETACIÓN IFI
	1ª M	2ªM		IgM		IgG		
				1ºM	2ºM	1ºM	2ºM	
85	N	N	N	N	N	N	N	N
86	N	N	N	P	P	N	N	P
87	N	N	N	N	N	N	N	N
88	N	N	N	N	N	N	N	N
89	N	P	P	N	P	N	N	P
90	P	P	P	N	N	P	P	P
91	P	P	P	N	P	N	P	P
92	N	N	N	N	N	N	N	N
93	N	N	N	N	N	N	N	N
94	N	N	N	N	N	N	N	N
95	N	N	N	N	N	N	N	N
96	N	P	P	N	P	P	N	P
97	P	P	P	P	P	P	P	P
98	N	N	N	N	N	N	N	N

P= Positivo N=Negativo

ANEXO 3

DETERMINACION DE SEROVAR PATÓGENO Y DE INFECCIONES RECIENTES Y PASADAS POR LA PRUEBA MAT

PACIENTES	MAT	SEROVAR				1 Y 2 M	RESULTADOS
		ICTEROH	FANEI	GRIPPOTH	CANICOLA		
1	1ºM	1/200	1/200	N	N	2 DIAS	DESCONOCIDO POR EL T DE COLECCIÓN
	2ºM	1/200	1/200	N	N		
2	1ºM	1/50	1/800	N	N	10 DIAS	PASADA
	2ºM	1/50	1/800	N	N		
3	1ºM	1/50	1/200	N	N	12 DIAS	PASADA
	2ºM	1/50	1/200	N	N		
4	1ºM	1/400	1/800	N	N	10 DIAS	PASADA
	2ºM	1/800	1/800	N	N		
5	1ºM	1/100	1/200	N	N	14 DIAS	PASADA
	2ºM	1/100	1/200	N	N		
6	1ºM	1/200	N	1/800	N	12 DIAS	PASADA
	2ºM	1/200	N	1/800	N		
7	1ºM	1/800	N	1/800	N	10 DIAS	PASADA
	2ºM	1/800	N	1/800	N		
8	1ºM	1/800	1/50	N	N	13 DIAS	PASADA
	2ºM	1/800	N	N	N		
9	1ºM	1/800	1/800	1/400	N	31 DIAS	RECIENTE
	2ºM	1/800	1/6400	1/800	N		
10	1ºM	N	N	N	N	24 DIAS	RECIENTE
	2ºM	1/400	1/100	N	N		
11	1ºM	N	N	N	N	12 DIAS	RECIENTE
	2ºM	1/800	1/100	N	N		
12	1ºM	1/800	1/100	1/400	1/400	26 DIAS	RECIENTE
	2ºM	1/800	1/100	1/3200	1/800		

PACIENTES	MAT	SEROVAR				1 Y 2 M	RESULTADOS
		ICTEROH	FANEI	GRIPPOTH	CANICOLA		
13	1°M	1/200	1/200	N	ene-50	11 DIAS	RECIENTE
	2°M	1/800	1/400	N	1/200		
14	1°M	1/100	N	1/200	1/200	13 DIAS	RECIENTE
	2°M	1/400	N	1/200	1/400		
15	1°M	N	N	N	N	11 DIAS	RECIENTE
	2°M	N	N	1/400	1/200		
16	1°M	N	N	N	N	17 DÍAS	RECIENTE
	2°M	N	N	1/400	1/400		
17	1°M	N	N	N	N	28 DIAS	NEGATIVA
	2°M	N	N	1/100	N		
18	1°M	N	N	N	N	37 DÍAS	RECIENTE
	2°M	N	N	1/400	1/200		
19	1°M	N	N	N	N	34 DÍAS	NEGATIVA
	2°M	N	N	N	N		
20	1°M	N	N	N	N	9 DÍAS	RECIENTE
	2°M	1/400	N	N	N		
21	1°M	1/200	N	1/400	1/200	33 DÍAS	RECIENTE
	2°M	N	1/400	N	N		
22	1°M	N	N	N	N	33 DÍAS	RECIENTE
	2°M	1/400	1/100	N	N		
23	1°M	N	N	N	N	27 DÍAS	RECIENTE
	2°M	N	N	1/400	N		
24	1°	N	N	N	N	12 DÍAS	RECIENTE
	2°	N	N	1/400	N		

N: Negativo

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DE TÍTULOS DE IgM e IgG PARA *Leptospira* spp E INFECCIONES RECIENTES Y PASADAS POR LA PRUEBA DE IFI

Pacientes	IFI				Interpretación
	IgM		IgG		
	1ªM	2ªM	1ªM	2ªM	Tipo de Infección
1	N	1/320	N	1/640	INFECCIÓN RECIENTE
2	N	1/320	N	N	INFECCION RECIENTE
3	1/320	1/640	1/640	1/640	INFECCION PASADA
4	N	1/320	N	1/640	INFECCION RECIENTE
5	N	1/640	N	1/320	INFECCION RECIENTE
6	1/320	1/640	1/160	1/320	INFECCION PASADA
7	1/320	1/320	1/320	1/320	INFECCIÓN PASADA
8	N	1/320	1/160	1/320	INFECCION RECIENTE
9	N	1/640	N	1/160	INFECCIÓN RECIENTE
10	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
11	1/320	1/640	1/160	1/160	INFECCION PASADA
12	1/160	1/640	1/160	1/320	INFECCIÓN RECIENTE
13	N	1/640	N	1/320	INFECCIÓN RECIENTE
14	1/80	1/80	1/320	1/320	INFECCIÓN PASADA
15	N	1/640	N	1/320	INFECCIÓN RECIENTE
16	N	1/160	N	N	INFECCION RECIENTE
17	1/1280	1/1280	1/1280	1/1280	INFECCIÓN PASADA
18	1/320	1/1280	1/160	1/640	INFECCION RECIENTE
19	1/320	1/640	1/160	1/320	INFECCIÓN RECIENTE

N: Negativo

Pacientes	IFI				Interpretación
	IgM		IgG		
	1ªM	2ªM	1ªM	2ªM	Tipo de Infección
20	1/640	1/640	1/2560	1/2560	INFECCIÓN PASADA
21	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
22	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
23	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
24	1/1280	1/1280	N	N	INFECCION PASADA
25	1/320	1/320	1/1280	1/1280	INFECCION PASADA
26	N	1/320	N	1/160	INFECCIÓN RECIENTE
27	N	1/640	1/80	1/80	INFECCIÓN RECIENTE
28	N	1/640	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
29	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
30	1/160	1/1280	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
31	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
32	1/320	1/2560	N	N	INFECCION RECIENTE
33	N	1/640	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
34	1/320	1/1280	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
35	N	1/320	N	N	INFECCIÓN RECIENTE
36	N	N	1/320	1/320	INFECCIÓN PASADA
37	N	1/640	1/320	1/320	INFECCIÓN RECIENTE
38	N	1/640	1/320	1/320	INFECCION RECIENTE
39	1/160	1/640	1/320	1/320	INFECCION RECIENTE

N: Negativo

ENCUESTA

DATOS GENERALES

3.Nombre de quién diligencia la ficha hospitalaria

9. Ocupación _____

10. Lugar de Origen : Departamento _____ Municipio _____

11. Dirección _____ Casa () Apartamento () Barrio _____

Teléfono _____ Tel Cel _____

12. Cuanto hace que vive en este lugar _____

13. Dirección de estudio ó trabajo _____

14. Ha viajado a otros lugares entre 3 meses a 10 días anteriores a la aparición de la enfermedad SI () NO ()

Donde _____

15. En que otro sitio diferente a la residencia o lugar de trabajo o estudio pasa la mayor parte de su tiempo? _____

16. Antecedentes personales patológicos?

Eruptivas SI () NO () DESCRIBA _____

Alérgicas SI () NO ()

DESCRIBA _____

Hematológicas SI () NO () DESCRIBA _____

Otra Enfermedad SI () NO () Cuáles? _____

17. Esquema de vacunación Completo () Incompleto ()

Trae carnet de vacunación SI () NO ()

Otras Vacunas (fiebre amarilla u otras , especificando fechas y número de dosis)

18. Fecha de inicio de los síntomas: Día _____ Mes _____
Año _____

19. Forma De Inicio de la enfermedad Súbita () Insidiosa ()

20. Fecha de Toma Muestra de suero

1era Muestra: Día _____ Mes _____ Año _____ Para (enfermedad)

2da Muestra: Día _____ Mes _____ Año _____ Para (enfermedad)

Otra Muestra: Día _____ Mes _____ Año _____ Para
(enfermedad) _____

Biopsia o muestras de otros tejidos :

21. Ha tenido dengue (fiebre, dolor corporal y erupción) antes? SI () NO () NO
SABE ()

Cuando?

LEPTOSPIROSIS Y HANTAVIRUS

22. Contacto con personas con enfermedad similar SI () NO () Cuándo?

23. Ha estado en contacto o ha sido mordido por animales o ha visto alguno en su casa?
SI () NO () Cuál animal _____

24. Ha visto roedores cerca de su casa? SI () NO () Donde?

LEPTOSPIROSIS

25. Acostumbra bañarse en ríos. Lagunas, arroyos o similares? SI () NO ()

26. Se ha bañado en las últimas dos semanas en ríos, lagunas o similares SI () NO ()

27. De que material es el techo de su vivienda

28. de que material son las paredes de su vivienda?

29. El Abastecimiento de agua de la vivienda es de

POZO () POTABLE () RIO () CARRO TANQUE () OTROS ()

ANEXO 6

FICHA EPIDEMIOLOGICA DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

Nombre del paciente _____ Cama _____

Fecha DIA _____ MES _____ AÑO _____
HORA _____

Instrucciones:

Marcar en cada casilla correspondiente a los días de hospitalización para cada síntoma, signo o paraclínico:

SI, NO (en paraclínicos en caso de no haberse realizado) o NS (no sabe).

En los paraclínicos y síntomas cuantificables, marcar el resultado de cada uno en su casilla.

DIA DE HOSPITALIZACIÓN	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FECHA												
SERVICIO												
SINTOMA /SIGNO CLINICO												
DIA FEBRIL												
TEMPERATURA												
ESCALOFRIOS												
CEFALEA												
DOLOR RETRO-OCULAR												
FOTOFOBIA												

MIALGIAS												
ARTRALGIAS												
NAUSEAS												
VOMITOS												
VOMITOS PERSISTENTES												
DIARREA												
TOS												
CONGESTION NASAL												
ODINOFAGIA												
LINFOADENOPATIAS												
PETEQUIAS												
PURPURA/EQUIMOSIS												
INYECCIÓN CONJUNTIVAL												
HEMATEMESIS												
HEMATOQUECIA												
MELENA												
EPISTAXIS												
HEMORRAGIA GINGIVAL												
HEMORRAGIA VAGINAL												
HEMOPTISIS												
HEMATURIA												
HEMATOMA EN VENIPUNCI												

ÓN												
DISNEA												
DOLOR TORAXICO												
EXPECTRORACIÓN												
CONSOLIDACION PULMONA												
DOLOR ABDOMINAL												
ICTERICIA												
HEPATOMEGALIA												
DIA DE HOSPITALIZACIÓN	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ASCITIS												
OLIGURIA												
ANURIA												
DISURIA												
POLIURIA												
POLAQUIURIA												
DIA FEBRIL												
TRATAMIENTO												
LIQUIDOS ENDOVENOSOS												
PLASMA												
PLAQUETAS												
GLOBULOS ROJOS												

VENTILACION MECANICA												
SEDACIÓN / ANALGESIA												
SEROLOGIAS												
DENGUE IgM												
DENGUE IgG												
LEPTOSPIROSIS IgM												
LEPTOSPIROSIS IgG												
HANTAVIRUS IgM												

ANEXO 7

CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE.

Estimado(a) Paciente y/o Acudiente:

Como parte de un proyecto de investigación apoyado por COLCIENCIAS, la Universidad del Norte de Barranquilla y la Secretaría de Salud Distrital, requerimos obtener muestras de sangre durante la fase aguda y convaleciente de su enfermedad de usted o su familiar menor de edad, así como también requerimos de información necesaria para llenar una ficha epidemiológica. Mediante este proyecto, se desea identificar cual es el agente causal del serotipo y la cepa del virus del Dengue, conocer el comportamiento de la enfermedad en la región y poder en un futuro implementar un programa de vigilancia y control. El nombre de su familiar, el suyo y la información suministrada serán confidenciales. El resultado positivo o negativo para dengue o leptospirosis, le será informado por la autoridad de salud.

Usted está en la libertad de permitirnos o no obtener las muestras de sangre, sin ningún tipo de retaliación en caso de que se niegue a participar en este estudio.

Dra. Claudia Romero-Vivas PhD.
Profesor Investigador Co-Supervisora

Dr. Andrew K.I. Falconar PhD.
Profesor Investigador Científico

Departamento de Ciencias Básicas Médicas de la Universidad del Norte
Km. 5 Antigua vía a Puerto Colombia
Tel: 3509285.
Fax: 3598852.

Yo, _____, identificado(a) con cédula de
ciudadanía, _____ de la ciudad de _____
permito la obtención de mi persona o mi familiar menor de edad,
_____ con identificación (tarjeta de identidad o registro
civil), _____ de dos muestras de sangre para el presente
estudio.

Firma del Acudiente: _____.

Fecha: _____.

Doctor a cargo del paciente _____

